

***In vitro* Etablierung eines Kaninchenmodells zur
Herstellung von hochvitalen Knochenimplantaten auf Basis
osteogener Zellen und bioresorbierbarer Trägergerüste**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Samira Fargali
aus Casablanca, Marokko

1. Referent: apl. Prof. Dr. Roland Wagner

2. Referentin: PD. Dr. Susanne Illenberger

eingereicht am: 07.08.2006

Mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.11.2006

Druckjahr 2006

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

1. **Samira Fargali**, Marc Barthold, Ingrida Majore, Volker Jäger: Three-Dimensional Cultivation of rabbit mesenchymal stem cells on bioresorbable, macroporous calcium phosphate scaffolds in vitro. *Int. J. Artif. Org.* **26**, 859, 2003.
2. **Samira Fargali**, Marc Barthold, Manfred Rohde, Ingrida Majore, Volker Jäger: In vitro cultivation of rabbit mesenchymal stromal cells on 3D bioresorbable calcium phosphate scaffolds for the generation of bone tissue implants. In: M. Fussenegger, F. Gòdia (eds.) 'Animal Cell Technology Meets Genomics', Springer. Pub., Dordrecht, Netherlands, 241-243, 2005.
3. Marc Barthold, Ingrida Majore, **Samira Fargali**, Frank Stahl, René Schulz, Susann Lose, Hubert Mayer, Volker Jäger: 3D-cultivation and characterisation of osteogenic cells for the production of highly viable bone tissue implants. In: M. Fussenegger, F. Gòdia (eds.) 'Animal Cell Technology Meets Gnomics', Springer. Pub., Dordrecht, Netherlands, 199-205, 2005.
4. Marc Barthold, **Samira Fargali**, Ingrida Majore, Nadia Zghoul, Frank Stahl, Manfred Rohde, Hubert Mayer, Volker Jäger: Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffolds in fixed bed bioreactors. *Tissue Eng.* **9**, 848, 2003.
5. Volker Jäger, Marc Barthold, **Samira Fargali**, Ingrida Majore, Nadia Zghoul, Frank Stahl, Manfred Rohde, Hubert Mayer: 3-D cultivation and monitoring of bone precursor cells on calcium phosphate scaffolds in fixed bed bioreactors. *Int. J. Artif. Org.* **26**, 829, 2003.
6. Ingrida Majore, Marc Barthold, Frank Stahl, René Schulz, Susann Loose, Hubert Mayer, **Samira Fargali**, Volker Jäger: Optimization of cell culture conditions and comparative analysis of the proliferation and differentiation of human osteoprogenitor cells by DNA microarray analysis and non-invasive methods. *Int. J. Artif. Org.* **26**, 869, 2003.

Tagungsbeiträge:

1. **Samira Fargali**, Marc Barthold and Volker Jäger: Characterisation of in vitro differentiation and mineralization of stromal rabbit cells for generation of engineered bone. First German-Chinese workshop on Tissue and Bioprocess Engineering, September 23-25; 2002, Stuttgart, Germany (Poster).
2. **Samira Fargali**, Marc Barthold, Manfred Rohde, Ingrida Majore, Volker Jäger: In vitro cultivation of rabbit mesenchymal stromal cells on 3D bioresorbable calcium phosphate scaffolds for the generation of bone tissue implants. 18th ESACT-Meeting, May 11-14, 2003 in Granada, Spain (Poster).
3. **Samira Fargali**, Marc Barthold, Manfred Rohde, Ingrida Majore, Volker Jäger: Three-dimensional cultivation of mesenchymal stem cells on bioresorbable, macroporous calcium phosphate scaffolds in vitro. 1st World Congress on Regenerative Medicine, October 22-24, 2003 in Leipzig, Germany (Poster).
4. Marc Barthold, **Samira Fargali**, Ingrida Majore, Nadia Zghoul, Frank Stahl, Manfred Rohde, Hubert Mayer, Volker Jäger: Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffolds in fixed bed bioreactors. 2nd Meeting of the European Tissue Engineering Society, September 3-6, 2003 in Genoa, Italy (Poster).
5. Ingrida Majore, Marc Barthold, Frank Stahl, René Schulz, Susann Loose, Hubert Mayer, **Samira Fargali**, Volker Jäger: Optimization of cell culture conditions and comparative analysis of the proliferation and differentiation of human osteoprogenitor cells by DNA microarray analysis and non-invasive methods. 1st World Congress on Regenerative Medicine, October 22-24, 2003 in Leipzig, Germany (Poster).
6. Marc Barthold, **Samira Fargali**, Ingrida Majore, Nadia Zghoul, Volker Jäger: Herstellung von hochvitalen Knochenimplantaten in Festbett-Perfusions-bioreaktoren. 21. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen / Forum Life Science 2003, April 2-4, 2003 in Munich, Germany.
7. Marc Barthold, Ingrida Majore, **Samira Fargali**, Frank Stahl, René Schulz, Susann Lose, Hubert Mayer, Volker Jäger: 3D-cultivation and characterisation of osteogenic cells for the production of highly viable bone tissue implants. 18th ESACT-Meeting, May 11-14, 2003 in Granada, Spain.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Zellkulturtechnik im Bereich Bioverfahrenstechnik, später Strukturbiologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Projektes „*Tissue Reactor*“ (G5RD-CT 2000-00282) durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Roland Wagner und Frau Priv. Doz. Dr. Susanne Illenberger möchte ich mich für die Übernahme der Referate und die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Lebenswissenschaften der TU Braunschweig bedanken.

Herrn Dr. Volker Jäger danke ich besonders sehr für seine hervorragende Betreuung, für die Korrektur der Arbeit und die jederzeit gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. Manfred Rohde möchte ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen danken.

Frau Dr. Faiza Rharbaoui möchte ich für die Hilfestellung bei der Einarbeitung in die histologischen Techniken danken.

Weiterhin danke ich insbesondere Herrn Dr. Marc Barthold für die praktische Einführung in die Zellkulturtechnik, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, seine Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei dem Arbeiten mit dem Bioreaktorsystem.

Der gesamten ehemaligen Abteilung Zellkulturtechnik danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich Frau Nadia Zghoul, Herrn Dr. Elsayed Ahmed Elsayed, Herrn Dr. Morris Hosseini und Herrn Carsten Griesel.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Melita Vidakovic, Frau Dr. Corinna Mauth, Frau Dr. Mariela Bollati, Frau Christin Dangel, Herrn Dr. Marcelo Comini Olmedo und Herrn Dr. Marcus Gereke für die freundliche Unterstützung.

Je remercie tout particulièrement mon Mari, Mohamed pour son soutien continu, sa *patience* et sa *compréhension* lors de ce travail de doctorat, mais aussi dans la vie de tous les jours.

Je dédie également ce travail à mes parents et à ma famille pour leur encouragement sans relâche.

Je dédie finalement cette thèse aussi à mon fils, Elias, qui est venu en égayer l'écriture et m'apporter une énergie nouvelle.

À mes parents
À mon mari
À mon fils (Elias)
À mes frères et soeurs
À mes amis

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Biologie des Knochens	1
1.1.1. Funktion und Aufbau des Knochens	1
1.1.2. Die Zusammensetzung des Knochens	3
1.1.2.1. Mesenchymale Stammzellen und Osteoprogenitoren	4
1.1.2.2. Osteoblasten	5
1.1.2.3. Osteocyten und Bone Lining Cells	6
1.1.2.4. Osteoklasten	8
1.1.3. Knochenentwicklung <i>in vivo</i>	9
1.2. Proliferations- und Differenzierungsfaktoren osteogener Zellen	9
1.2.1. L-Ascorbat	10
1.2.2. Dexamethason	10
1.2.3. β -Glycerophosphat	11
1.2.4. Cytokine	11
1.2.4.1. <i>Insulin-like Growth Factor</i> (IGF) und Insulin	11
1.2.4.2. <i>Fibroblast Growth Factors</i> (FGF)	12
1.2.4.3. <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF)	13
1.2.4.4. <i>Platelet Derived Growth Factor</i> (PDGF)	14
1.3. Therapiemöglichkeiten zur Knochenheilung	15
1.4. Prinzip des Tissue Engineering	16
1.4.1. Trägergerüste zur dreidimensionalen Zellkultivierung	17
1.4.2. Durchführung der 3D-Zellkultur	20
1.5. Problemstellung und Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.2. Isolierung und Kultivierung osteogener Kaninchenzellen	24
2.2.1. Vorbereitung der Lösungen und Kulturmedien	24
2.2.2. Isolierung von Knochenvorläuferzellen	26
2.2.2.1. Gewinnung von Kaninchenknochenmark aus Femur und Tibia	26
2.2.3. Subkultivierung	28
2.2.4. Kultivierung der Progenitorzellen in optimiertem Medium	29
2.2.5. Einfrieren von Zellen	29
2.2.6. Auftauen von Zellen	29
2.2.7. Populationsverdopplungszeit	30
2.3. Analytische Methoden	30
2.3.1. Parameter zur Überprüfung der Zellproliferation	30
2.3.1.1. Zellvitalitätsbestimmung mittels WST-1-Test	30
2.3.1.2. Glucose/Lactat-Konzentrationsbestimmung	31
2.3.1.3. Gesamtproteinbestimmung mittels Micro-BCA-Methode	31
2.3.1.4. Zellzahlbestimmung mittels Hoechst 33258 Fluoreszenzfärbung	32
2.3.2. Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität	33
2.3.3. Trypanblauausschluss zur Zellzählung	33
2.3.4. Parameter zur Überprüfung der Differenzierung der Zellen	34
2.3.4.1. Alkalische Phosphatase (AP)	34
2.3.4.2. Osteocalcinbestimmung mittels ELISA	35
2.3.5. Parameter zur Überprüfung der Mineralisierung	36
2.3.5.1. Bestimmung der Calciumablagerung in der extrazellulären Matrix	36
2.4. Rasterelektronenmikroskopie	36
2.4.1. Probenvorbereitung	36

2.5. Histologische Methoden	37
2.5.1. Fixierung der Zellen mittels Ethanol	37
2.5.2. Fixierung mittels 4% Paraformaldehyd	37
2.5.3. Gesamtkollagenfärbung	38
2.5.4. Sudan III-Färbung von Adipocyten	38
2.5.5. Calciumnachweis nach von Kossa	38
2.5.6. Alkalische Phosphatase-Färbung (AP)	39
2.5.7. Vitalitätstest	39
2.5.8. Paraffineinbettung von Osteoscaf Trägern	40
2.5.9. Anfertigung von Trägerschnitten	41
2.5.10. Färbung der Trägerschnitte	41
2.5.10.1. DAPI-Färbung	41
2.5.10.2. Hematoxylin/Eosin-Färbung von Osteoscafschnitten	42
2.6. 3D-Zellkulturen.....	42
2.6.1. Verwendete Trägermaterialien	42
2.6.1.1. Calciumphosphat (CAMCERAM®)	42
2.6.1.2. PLGA/CaP (Osteoscaf)	43
2.6.2. Dynamisches 3D-Kultivierungssystem	43
2.6.2.1. Kulturführung im dynamischen 3D-Kultivierungssystem	44
2.6.3. Das Bioreaktorsystem	45
2.6.3.1. Prinzip des Bioreaktors	45
2.6.3.2. Kulturführung im Bioreaktor	46
3. Ergebnisse und Diskussion	47
3.1. Zellisolierung, -proliferation und osteogene Differenzierung	47
3.1.1. Gewinnung von primären Kaninchenzellen	47
3.1.2. Subkultivierung osteogener Kaninchenzellen	49
3.1.3. Charakterisierung der Kaninchenknochen-Vorläuferzellen	55
3.2. Entwicklung eines für die Kultivierung osteogener Kaninchenzellen geeigneten serumreduzierten Mediums	60
3.2.1. Induktion der Adipogenese unter Zusatz von Kaninchenserum	60
3.2.2. Einfluss von Cytokinen auf Kaninchenknochen-Vorläuferzellen	65
3.2.3. Proliferation, Differenzierung und Mineralisierung osteogener Zellen im optimierten Medium	70
3.2.3.1. Einfluss der Cytokinkombination auf die Proliferation	71
3.2.3.2. Einfluss der Cytokinkombination auf die Differenzierung	73
3.2.3.3. Einfluss der Cytokinkombination auf die Mineralisierung	75
3.3. Kultivierung osteogener Kaninchenzellen in serumreduziertem Medium unter Zusatz von Perfluorcarbon-Emulsionen	77
3.4.1. Statische Kultur	80
3.4.1.1. Untersuchung der Besiedlungsdichte	80
3.4.1.2. Zellwachstum auf Camceram und Osteoscaf	85
3.4.2. Das Bioreaktorsystem	89
3.4.2.1. Das Proliferationsverhalten von Kaninchenosteoprogenitoren auf Camceram	91
3.4.2.2. Langzeitkultivierung osteogener Kaninchenzellen auf Camceram im Bioreaktor	93
3.4.2.3. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von besiedelten Camceram Trägergerüsten	95
3.4.2.4. Langzeitkultivierung osteogener Kaninchenzellen auf Osteoscaf im Bioreaktor	97
3.4.2.5. Histologische Untersuchungen von Zellen auf Osteoscaf in statischer Kultur und im Bioreaktor	101
4. Allgemeine Diskussion.....	103
4.1. Etablierung des Kaninchenmodells	104
4.2. Induktion der Adipogenese unter Zusatz von Kaninchenserum.....	105
4.3. Entwicklung eines geeigneten Serum-reduzierten Mediums	106
4.4. 3D-Kultivierung	108
4.4.1. Diskussion der Besiedlungsdichte und der Träger für die 3D-Zellkultur	108

4.4.2. Diskussion des Perfusionssystems	109
5. Zusammenfassung und Ausblick	112
6. Literaturverzeichnis.....	115
7. Abkürzungen	127

1. Einleitung

Knochenersatzmaterialien werden seit langer Zeit häufig zur Behandlung von Verletzungen und Schädigungen des Knochens angewendet. Sie sind derzeit ein essentieller Bestandteil implantologischer Therapieverfahren. Dennoch konnten trotz intensiver Untersuchungen, besonders *in vivo*, bis heute keine völlig zufriedenstellenden Resultate erzielt werden. Implantate befinden sich *in vivo* in einer Umgebung, in der verschiedene komplexe Mechanismen zusammenwirken. Damit fehlen einem solchen Zellkonstrukt *in vitro* die notwendigen Informationen, um eine erfolgreiche Implantation zu gewährleisten [Minuth et al., 2003]. Die Ergebnisse der hier dargestellten Arbeit stellen die Basis für nachfolgende *in vivo* Untersuchungen zur Optimierung der Implantation dar.

In den nachfolgenden Abschnitten werden zunächst die Biologie des Knochens, die Grundlagen der Gewebetechnik sowie deren Anwendung am Knochen beschrieben. Außerdem wird auf die Kulturbedingungen der Knochen aufbauenden Zellen eingegangen werden und es werden die Faktoren, welche die Differenzierungsprozesse beeinflussen, erläutert. Anschließend wird eine Übersicht über Trägermaterialien und deren Besiedlung vorgestellt.

1.1. Biologie des Knochens

1.1.1. Funktion und Aufbau des Knochens

Das Knochengewebe ist das kompakte Material, aus dem das Skelett besteht und erfüllt viele wichtige Aufgaben. Es dient dem Schutz darunter liegender Organe, als mechanische Stütze des Körpers, der Bewegung, sowie als Quelle für anorganische Mineralien. Darüber hinaus ist es aktiv an der Regulierung des Calciumstoffwechsels im Körper beteiligt. Der Knochen enthält das rote Knochenmark, in dem die Blutzellen gebildet werden sowie gelbes Knochenmark, das hauptsächlich aus Fett besteht und vorwiegend als Energiereservoir dient [Baron et al., 1993; Yaszemski et al., 1996]. Im Gegensatz zum Knorpel ist der Knochen weder schneidbar noch biegsam, was auf eine hohe Druckfestigkeit (14-16 kp/mm²) und Zugfestigkeit (10 kp/mm²) zurückgeführt werden kann [Moll und Moll, 2000].

1. Einleitung

Der Knochen reagiert auf viele Signale mit komplexen Mechanismen. Dabei wird sowohl der Knochenaufbau aber auch der Abbau durch Hormone und Wachstumsfaktoren unterstützt. So stimuliert beispielsweise das Parathormon die Knochenresorption, wohingegen Calcitonin am Knochenaufbau beteiligt ist. Knochen besitzen unterschiedliche Formen, wie Röhrenknochen, kurze, kompakte und flache Knochen. Histologisch lassen sich zwei Knochenarten unterscheiden:

- Geflechtknochen (Faserknochen)

Der Geflechtknochen oder Faserknochen entsteht durch desmale Ossifikation. Er kommt physiologisch nur noch in den Alveolen der Zähne und an den Suturen der platten Schädelknochen vor. Nach einer Fraktur kann der Knochen wieder aufgebaut werden, wobei sich Lamellenknochen ausbilden. Sowohl die Kollagenfasern, als auch die Knochenzellen im Geflechtknochen sind ungeordnet verteilt. Die relativ hohe Zugfestigkeit und Biegeungselastizität dieser Knochen ist auf seinen geringen Mineralgehalt zurückzuführen.

- Lamellenknochen

Das lamellenartige Knochengewebe besteht aus einer äußeren Schicht, der *Substantia compacta* sowie einer inneren Schicht, die als *Substantia spongiosa* bezeichnet wird. Ihre Hohlräume enthalten Knochenmark. Das Osteon (Havers-System) ist die strukturelle Grundlage des Lamellenknochens.

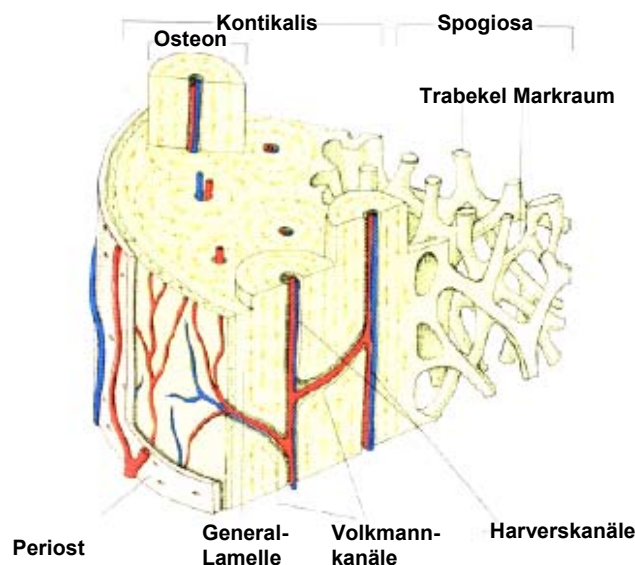


Abb. 1.1: Darstellung der Struktur des Knochengewebes [Schäffler und Schmid, 1997].

1. Einleitung

Lamellenknochen sind stärker mineralisiert, weisen jedoch regelmäßige, parallel angeordnete Kollagenfasern auf. Zwischen den Lamellen liegen die Osteocyten (s. Abb. 1.1). In der Mitte der Osteone verläuft der Osteonkanal (Havers-Kanal) mit Blutgefäßen. Zwischen den Osteonkanälen befinden sich die querverbindenden Volkmann-Kanäle. Ein ständiger Umbau der Osteone hinterlässt Osteon-Teilstücke, sog. Schaltlamellen, die den Raum zwischen den Osteonen wie mit Schotter auffüllen. An der äußeren und inneren Oberfläche der Kompakta können oberflächenparallele Grundlamellen auftreten. Kittlinien begrenzen Osteone und Schaltlamellen. Die Trabekel der Spongiosa bestehen auch aus Lamellen, die hier aber meist nicht als Osteone organisiert sind, sondern unregelmäßig gestaltete Lamellen bilden. Ihre Reduzierung im Alter ist das typische Merkmal der Osteoporose.

1.1.2. Die Zusammensetzung des Knochens

Der Knochen besteht zu 45% aus einer anorganischen Matrix, zu 25% aus organischen Substanzen sowie aus 20% Wasser. Der Hauptanteil der Mineralien sind Calciumverbindungen, wobei Phosphat zu 50% und Calcium zu 35% vorliegen. Der Knochen bildet ein Mineraliendepot, das hauptsächlich als Hydroxylapatit im Knochen eingelagert wird und die Stabilität des Knochens gewährleistet. Die organische Grundsubstanz wird Osteoid genannt, welche durch die Einlagerung von Calciumsalzen stabilisiert wird. 95% der organischen Matrix bestehen aus Kollagen Typ I, die restlichen 5% hingegen aus Proteoglykanen, wie z.B. Osteocalcin (OC) und einigen nicht-kollagenen Proteinen [Moll und Moll, 2000]. Zusätzlich enthält der Knochen auch Knochenzellen, die aus den Mesenchymzellen stammen. Daraus bilden sich die Progenitorzellen (s.1.1.2.1), die schließlich zu Osteoblasten (s. 1.1.2.2) differenzieren können. Diese können sich nicht mehr teilen und entwickeln sich teilweise zu Osteocyten (s.1.1.2.3). Es gibt fünf Hauptarten Knochenzellen im Knochengewebe: Osteoprogenitoren, Osteoblasten, Osteocyten, sog. „*Bone Lining Cells*“ sowie Osteoklasten [Marks und Hermey, 1996].

1. Einleitung

1.1.2.1. Mesenchymale Stammzellen und Osteoprogenitoren

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind undifferenzierte Zellen, die in einer Vielzahl von Organen und Gewebe vorkommen: Knochenmark, Nabelschnurblut, kompakten Knochen, Fettgewebe, peripherem Blut und embryonalen Somiten-mesoderm [Charbord et al., 2002; Kuznetsov et al., 2001; Campagnoli et al., 2001; Gronthos et al., 2001]. Der Begriff MSCs geht auf die Arbeiten von Till und McCulloch zurück, die die MSCs als Zellen definieren, welche in der Lage sind sich selbst zu erneuern [Till und McCulloch, 1961]. Im Jahr 1966 gelang es Friedenstein und Petrakova dann erstmals Osteoprogenitorzellen aus Rattenknochenmark zu isolieren [Friedenstein et al., 1966]. Dabei bestand die gesamte Zellpopulation an Knochenmarkzellen nur zu etwa 0.001-0.01% aus MSCs [Pittenger et al., 1999], welche anschließend durch eine Vielzahl von Untersuchungen charakterisiert wurde [Kuznetsov et al., 1997; Prockop, 1997; Javazon et al., 2001; Digirolamo et al., 1999]. Knochenmark enthält sowohl hämatopoetische Zellen als auch Vorläufer nicht-hämatopoetischer Zellen [Caplan, 1991]. Letztere werden *Colony forming Units - Fibroblasts* (CFU-F) genannt und bildet in Kulturmedien mit 10-20% Serum typische Kolonien. Viele Wachstumsfaktoren stimulieren die Kolonienbildung, wie z.B. PDGF-BB, welcher die Fähigkeit diese Zellkolonien zu stimulieren besitzt [Friedenstein et al., 1992]. Prinzipiell haben MSCs nicht die Fähigkeit sich über längere Zeiträume in Kultur zu vermehren, jedoch können sie sich in viele verschiedene Körperzellen entwickeln. Sie differenzieren *in vitro* unter dem Einfluss bestimmter spezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu verschiedenen Gewebetypen (Knochen, Herzmuskel, Fett, Knorpel, Stroma und Sehnen) (s. Abb. 1.2) [Toma et al., 2002; Pittenger et al., 2000].

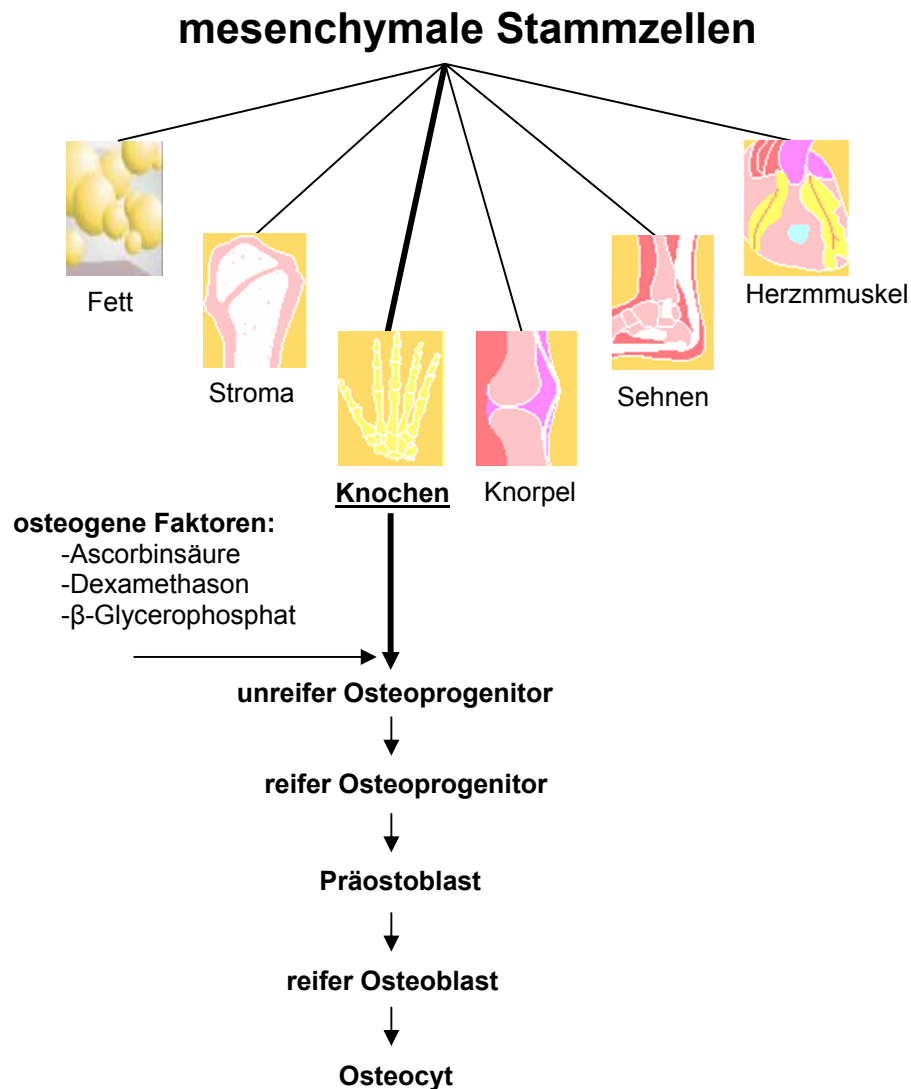


Abb. 1.2: Darstellung der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen des Knochenmarks *in vitro* modifiziert nach [Caplan und Bruder, 2001].

1.1.2.2. Osteoblasten

Histologisch betrachtet sind Osteoblasten kleine, kuboidale und ausgeprägt basophile Zellen, die Knochenmatrix bilden und regulieren. Sie stammen aus den Mesenchymstromazellen, die ursprünglich pluripotent sind und sich außerdem zu Fibroblasten, Myoblasten, Adipocyten und Chondrocyten entwickeln können [Owen, 1985]. Aus den Mesenchymzellen bilden sich so genannte Vorläuferzellen, die sich stark vermehren und teilweise zu Präostoblasten differenzieren. Die Präostoblasten befinden sich im Periosteum und im Knochenmarkstroma. Ihr Proliferationspotential ist sehr begrenzt und sie entwickeln sich zu den terminalen „ruhenden“ Osteoblasten,

1. Einleitung

die morphologisch abgeflacht sind. Die meisten Osteoblasten bedecken die Oberfläche der Knochenbälkchen und entwickeln sich weiter zur Osteocyten und *Bone Lining Cells* oder erleiden einen vorprogrammierten Tod (Apoptose) [Manolagas, 2000].

Hauptsächliche Aufgabe der Osteoblasten ist Knochenmatrixbildung. Sie produzieren Kollagen vom Typ I und werden dadurch gekennzeichnet. Ein typischer Marker für die Aktivität der Osteoblasten ist die Alkalische Phosphatase (AP), obwohl ihre Rolle in der Knochenbildung noch nicht vollständig geklärt ist [Nawawi et al., 1996; Magnusson et al., 1999]. AP gehört zu einer Gruppe von membranständigen Enzymen [Low und Saltiel, 1988] und ihre Aktivität spiegelt die unterschiedlichen Stufen des Differenzierungsgrades wieder [Wlodarski et al., 1990]. Durch Spaltung kristallisationshemmender Pyrophosphate kann sie eine Störung der Calciumphosphat-Akkumulation unterbinden und somit die Matrixmineralisation fördern.

Osteoblasten können *in vivo* und *in vitro* auch durch Osteocalcin (OC) charakterisiert werden. Seine Synthese erfolgt ausschließlich von Osteoblasten in der Phase der Matrixmineralisation und es bindet fest an Hydroxylapatit. Etwa 70% des neu-synthetisierten Osteocalcins wird in den Knochen eingebaut, während ca. 30% im Blut zirkulieren [Price und Nishimoto, 1980; Poser et al., 1980]. Im Blut ist OC immunoquantitativ nachweisbar [Ylikoski et al., 1998]. So wie Osteocalcin gehören andere Protein wie Osteopontin, Osteonectin und Knochensialoprotein zur Gruppe der nicht-kollagenen Matrixbestandteile. Sie bilden im extrazellulären Raum das Osteoid, worauf die Mineralisation bzw. die Akkumulation von Calcium und Phosphat in Form von Hydroxylapatitkristallen erfolgt [Malaval et al., 1994]. Osteoblasten besitzen auch Rezeptoren für das Parathormon, Glykokortikoide, Vitamin D, Sexualhormone und für Cytokine, die das Wachstum und die Differenzierung von Osteoblasten beeinflussen [Pfeilschifter et al., 1993].

1.1.2.3. Osteocyten und Bone Lining Cells

Bei der Einlagerung des Hydroxylapatits in die extrazelluläre Matrix stirbt ein Großteil der Osteoblasten (~65%) ab [Manolagas, 2000], während ein weiterer Anteil dieser Zellen in einen Ruhezustand übergeht und entweder auf den Knochenoberflächen als *Bone Lining Cells* oder in der Matrix eingeschlossen als Osteocyten zu finden ist.

1. Einleitung

Bone Lining Cells (BLCs) sind flachgestreckte Zellen, die aufgrund ihrer metabolischen Inaktivität nur geringe Mengen an Cytoplasma aufweisen und wenige Organellen besitzen. Sie liegen an der Skelettoberfläche und sind durch Zell-Zell-Kanäle, sogenannte Gap junctions mit benachbarten Osteocyten verbunden. Die Knochenoberfläche wird zu 94% von BLCs gebildet, so dass die Osteoblasten und Osteocyten nur zu einem geringen Anteil an der Knochenoberfläche zu finden sind (Osteoblasten 5% und Osteocyten 1%) [Duncan und Turner, 1995].

Über die Aufgabe der BLCs ist nur wenig bekannt. Man nimmt an, dass es sich dabei um Vorläuferzellen der Osteoblasten handelt. Dazu ist vorgeschlagen worden, dass die Differenzierung der BLCs durch das Parathormon zur aktiven Osteoblasten stimuliert wurde [Leaffer et al., 1995].

BLCs sind inaktiv und daher nicht in der Lage Knochenmatrix zu produzieren. Dennoch zeigten Studien von Chow et al., dass BLCs zu knochenbildenden Osteoblasten reaktiviert werden können [Chow et al., 1998] und die Regulation des Knochenbaus steuern können [Miller und Jee, 1987].

Osteocyten, die in Lakunen (Vertiefungen) vorliegen, weisen eine sternförmige Gestalt auf. Über diese Cytoplasmaausläufer, die jeweils in ein Knochenkanälchen (*Canaliculi ossei*) führen, stehen die Osteocyten untereinander in Verbindung, so dass sie dadurch sowohl miteinander als auch mit umliegenden Osteoblasten und BLCs kommunizieren können. Die Nährstoffe, die über das Blut transportiert werden, erreichen die Osteocyten entweder durch Diffusionsprozesse über *Canaliculi ossei* und die Cytoplasmaausläufer oder direkt über die Gap junctions der Osteocyten [Toppets et al., 2004]. Da über Diffusion eine Nährstoffversorgung nur in direkter Umgebung gewährleistet werden kann, überleben nur Osteocyten, die in einem geringeren Abstand als 0,2 mm zu den Blutgefäßen liegen [Cross und Mercer, 1995].

Im Vergleich zur Osteoblasten weisen Osteocyten eine geringe metabolische Aktivität auf, obwohl sie eine wichtige Funktion bei der ständigen Erneuerung der organischen Matrix des Periosts haben [Banks, 1993]. Sie besitzen nicht nur die Fähigkeit Knochensubstanz zu produzieren, sondern haben auch in begrenztem Umfang das Potential zur Knochenresorption.

Durch das Parathormon und Vitamin D können Osteocyten die umliegende mineralisierte Matrix resorbieren (Osteolyse). Im Gegensatz dazu bewirkt das

1. Einleitung

Calcitonin, welches in den parafollikulären Zellen der Schilddrüse gebildet wird, eine Calciumeinlagerung in die Matrix.

1.1.2.4. Osteoklasten

Der Knochen unterliegt während des gesamten Lebens einem ständigen Umbauprozess, wobei die Osteoklasten eine wichtige Rolle in der Resorption der Knochensubstanz spielen. Osteoklasten sind azidophile, vielkernige Riesenzellen mit einem Durchmesser von 50 bis 100 μm . Sie befinden sich auf der Skelettoberfläche in den Resorptionslakunen (Howship-Lakunen) und stammen von der Monocyten-Makrophagen Linie ab, die aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgeht [Parfitt et al., 1987]. Osteoklasten besitzen einen ausgeprägten Golgi-Apparat, sind reich an Mitochondrien, Vakuolen, Endosomen und lysosomalen Enzymen, haben aber verhältnismäßig wenig endoplasmatisches Retikulum. Charakteristisch für Osteoklasten, die durch die Verschmelzung mononukleärer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark entstehen, ist die Expression von Calcitonin- und Vitronectinrezeptoren ($\alpha\text{v}\beta 3$) sowie der tartratresistenten sauren Phosphatase.

Aktive Osteoklasten haben einen direkten Kontakt mit der Knochenoberfläche und weisen spezifische Membranzonen auf: Im Zentrum befindet sich eine helle, streifige und vesikelreiche Zone der Plasmamembran, in der die Zellmembran in Form eines Bürstensaums stark gefaltet ist. Sie wird als „*ruffled border*“ bezeichnet und ist der Bereich der Knochenresorption. Die Siegelzone ist eine weitere Membranzone mit der die Osteoklasten an die Oberfläche des Knochens geheftet sind. Sie ist reich an Mikrofilamenten und frei von Organellen und wird aufgrund dieser Charakteristika als „*clear zone*“ bezeichnet. Die übrige Plasmamembran der Osteoklasten wird als Basalmembran bezeichnet.

Die Hauptaufgabe der Osteoklasten besteht im Abbau der Knochenmatrix. In der Resorptionszone der Osteoklasten werden Wasserstoffionen über Protonenpumpen zwischen Osteoklasten und Knochen gepumpt und bewirken die Senkung des pH-Wertes [Blair et al., 1989], so dass sich die Hydroxylapatitkristalle aus der Knochenmatrix lösen. Der Abbau der organischen Matrix wird im Gegensatz dazu durch proteolytische Enzyme gewährleistet [Väänänen, 1996].

1.1.3. Knochenentwicklung *in vivo*

Die Bildung von Knochensubstanz ist ein kontinuierlicher Mechanismus, der im Körper während der Embryonalentwicklung, bei Umbau- und Wachstumsprozessen oder bei einer Knochenbruchheilung erfolgen kann. Dies deutet darauf hin, dass es im Körper eine Vielzahl an Zellen gibt, die die Fähigkeit haben während des ganzen Lebens Knochen zu bilden. Nach einer Fraktur heilt Knochengewebe durch die Bildung von neuer Knochensubstanz, die dem Knochen wieder eine hohe Stabilität verleiht. Dabei unterliegt die Knochenheilung demselben Prozess wie die Knochenbildung bei der embryonalen Entwicklung.

Die embryonale Knochenbildung kann prinzipiell in zwei verschiedene Wege eingeteilt werden: die intramembranöse und die endochondrale Knochenbildung. Charakteristisch für die intramembranöse Ossifikation ist die Bildung von Faserknochen durch die direkte Ablagerung von Calcium. Aus diesen Faserknochen entwickeln sich durch Osteoblasten in Abwesenheit von Knorpelzellen lamelläre Knochen. Auf diesem Wege werden die Schädelknochen sowie die Schlüsselbeine gebildet. Bei der endochondrale Ossifikation (*Osteogenesis cartilaginea*) wird der Knochen aus formatiertem Knorpel gebildet. Diese Art der Osteogenese betrifft z.B. das Becken und die Wirbelsäule. Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, in dem zunächst ein aus Knorpel bestehendes Modell angelegt wird, das später durch Knochen, wie z.B. Röhrenknochen ersetzt wird.

1.2. Proliferations- und Differenzierungsfaktoren osteogener Zellen

Es existiert eine Reihe von Molekülen einschließlich Hormonen, Vitaminen und lokalen Wachstumsfaktoren, die den Stoffwechsel der Osteoblasten steuern und regulieren. Diese Faktoren beeinflussen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Synthese und die Sekretion der Knochensubstanz [Mayahara et al., 1993; Mitlak et al., 1996]. Cytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von osteoblastären Zellen hinsichtlich ihrer Proliferation, Differenzierung und der Knochenbildung. Dennoch ist der molekulare Mechanismus dieser Faktoren auf die osteoblastäre Entwicklung und Reifung noch nicht eindeutig geklärt. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Faktoren näher beschrieben, welche stimulierend oder inhibierend auf die Proliferation sowie Differenzierung osteogener Zellen wirken und in der vorliegenden Arbeit eingesetzt worden sind.

1. Einleitung

1.2.1. L-Ascorbat

L-Ascorbat (Vitamin C) bzw. dessen im Nährmedium stabileres Derivat L-Ascorbat-2-Phosphat ist essentiell für die Kollagenproduktion und somit für die Stabilität der extrazellulären Matrix. Es dient als wichtiger Kofaktor bei der Hydroxylierung der Prolin- und Lysin-Reste während der Kollagensynthese [Franceschi und Iyer, 1992; Franceschi et al., 1994]. Die optimale Konzentration von L-Ascorbat im Medium liegt zwischen 50-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, wobei eine Konzentration von 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (0,2 mM) ausreicht, um eine Kollagenbildung in osteoblastären Zellkulturen zu induzieren [Otsuka et al., 1999].

L-Ascorbat ist sowohl für die Expression von osteoblastären Markern als auch für die Mineralisierung der Osteoblasten notwendig [Aronow et al., 1990; Gerstenfeld et al., 1987; Franceschi und Iyer, 1992; Franceschi et al., 1994]. Untersuchungen an einer osteogenen Mauszelllinie (MC3T3-E1) zeigten, dass eine aktive, Na^+ -abhängige Aufnahme der reduzierten Form des L-Ascorbats wichtig für die Osteoblastendifferenzierung ist [Franceschi et al., 1995]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass L-Ascorbat bei Chondrocyten auch die Proteinexpression des Kollagens Typ-II sowie der Proteoglykane der Knorpelmatrix stimuliert [Clark et al., 2002].

1.2.2. Dexamethason

Dexamethason oder 9-Fluor-16 α -methylprednisolon ist ein Glucocortikoid, welches in seiner Wirkung dem Cortisol (Hydrocortison) ähnelt. Es bindet an den cytoplasmatischen Glucocorticoidrezeptor und übernimmt eine bedeutende Rolle bei der osteogenen Differenzierung von Knochenvorläuferzellen. Eine Supplementierung von Dexamethason erhöht die Proliferation von Rattencalvarienzellen [Bellows et al., 1987] und die Bildung von „nodules“ (Knötchen) während der Mineralisierung von Rattenknochenmarkzellen [Maniatopoulos et al., 1988].

Des Weiteren stimuliert Dexamethason die Differenzierung von Chondrocyten und beeinflusst somit die Expression der Alkalischen Phosphatase, welche zur Calciumablagerung während der Mineralisierung dient [Buckwalter et al., 1996].

Dexamethason hat auch in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren die Fähigkeit Knochenzellen zu regulieren. So zeigten z.B. Untersuchungen von Pri-Chen et al., dass FGF-2 (*fibroblast growth factor*) die osteogene Expression humaner Knochenzellen zusätzlich stimuliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die

1. Einleitung

Proliferation sowie die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen entscheidend beeinflusst werden kann [Pri-Chen et al., 1998].

1.2.3. β -Glycerophosphat

β -Glycerophosphat spielt eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch osteoblastäre Zellen. Mehrere Studien demonstrierten, dass der Zusatz von β -Glycerophosphat, das als Quelle für anorganische Phosphate dient, die Mineralisierung der extrazellulären Matrix *in vitro* induziert. Bellows et al. beobachteten bei der Kultivierung osteogener Rattencalvarienzellen die Bildung von „nodules“ unter Zusatz von β -Glycerophosphat über einen Zeitraum von 21 Tagen [Bellows et al., 1992]. Auch zahlreiche *in vitro* Studien an unterschiedlichen Kulturmodellen wie z.B. humanen Zellen aus dem Knochenmark [Coelho und Fernandes, 2000]; Rattencalvarienzellen [Aronow et al., 1990] zeigten den Effekt des β -Glycerophosphats auf die osteoblastäre Mineralisierung.

1.2.4. Cytokine

Es ist bekannt, dass die Regulierung des Knochenstoffwechsels über Cytokine gesteuert wird. Darüber hinaus weisen zahlreiche *in vivo* Studien nach, dass bestimmte Cytokine an der Stimulation der Osteogenese und dem Erhalt der Knochenmasse beteiligt sind [Nakamura et al., 1995; Mundy et al., 2001]. Dabei ist deren direkter Effekt auf osteoblastäre Zellen von zentraler Bedeutung.

Zahlreiche *in vitro* Studien haben die Wirkung dieser Wachstumsfaktoren wie z.B. IGF, FGF, PDGF-BB und EGF auf die Knochenzellentwicklung untersucht [Yang et al., 2000; Szczesny, 2002; Yu et al., 2003]. In den folgenden Abschnitten wird auf die Cytokine eingegangen, welche in der vorliegenden Arbeit für die Zellkultivierung eingesetzt worden sind.

1.2.4.1. *Insulin-like Growth Factor* (IGF) und Insulin

Insulin-like Growth Factors weisen ein Molekulargewicht von etwa 7,5 kDa auf und werden nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Geweben des Körpers, wie dem Knochengewebe produziert. Im Blut zirkulieren IGFs in einer Konzentration von

1. Einleitung

20 bis 80 nM [Rosen, 1999; Putnam und Mooney, 1996]. Zur Gruppe der IGFs gehören *Insulin-like Growth Factor –I* (IGF-I) und *–II* (IGF-II).

IGFs und Insulin teilen eine 70%ige Strukturhomologie bezüglich ihrer Aminosäuresequenz, so dass IGFs nicht nur eine ähnliche Struktur wie Insulin aufweisen, sondern auch eine ähnliche biologische Aktivität besitzen [Gloria et al., 2004]. Damit ist der Einfluss von IGFs auf die Osteogenese eng vergleichbar mit der Wirkung des 5,8 kDa schweren Polypeptidhormons Insulin.

Prä- und Osteoblasten besitzen Rezeptoren für IGFs sowie Insulin. Es gibt zwei IGF-Rezeptoren: der IGFR Typ I hat eine präferentielle Affinität zu IGF-I, die stärker ist als zu IGF-II oder Insulin. Der Typ II Rezeptor ist ein Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, an dem IGF-II bindet [Nissley und Kiess, 1991]. IGF-I und IGF-II erhöhen die DNA-, Protein- und Kollagensynthese sowie die Alkalische Phosphatase-Aktivität [Pollak et al., 1990]. Ihre Expression in osteoblastären Zellen wird allerdings durch Wachstumshormone und 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 beeinflusst [Chenu et al., 1990]. Es ist außerdem zu erwähnen, dass IGF-I bei der Stimulation von Osteoblasten etwa drei- bis viermal wirksamer ist als IGF-II [Centrella et al., 1990], so dass IGF-I die Bildung neuer Knochenmatrix effektiver reguliert und die intramembranöse Ossifikation beschleunigen kann [Hock et al. 1988; Trippel, 1998].

1.2.4.2. *Fibroblast Growth Factors* (FGF)

Fibroblast Growth Factors, sind Polypeptide, die einen starken Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen, insbesondere osteogener Zellen haben. Sie werden in Makrophagen, mesenchymalen Progenitorzellen, Chondrocyten und Osteoblasten synthetisiert [Barnes et al., 1999]. *Fibroblast Growth Factors* (FGFs) gehören zu einer Familie, welche derzeit aus 22 strukturverwandten Proteinen besteht [Yu et al., 2003]. Hierzu gehören auch der saure FGF-1 und der basische FGF-2, die eine Homologie von 50% aufweisen und an identische Zelloberflächenrezeptoren binden. Die FGFs sind in der extrazellulären Knochenmatrix gespeichert und damit in der Lage Knochenbildung *in vivo* zu stimulieren [Nakamura et al., 1995; Mayahara et al., 1993; Radomsky et al., 1998].

Bei zahlreichen Untersuchungen stellte sich heraus, dass FGF-2 im Vergleich zu FGF-1 hinsichtlich der Osteogenese eine größere Wirkung zugeschrieben wird [Barnes et al., 1999]. Zudem konnte gezeigt werden, dass FGF-2 einen mitogenen

1. Einleitung

Effekt auf die Proliferation von Präostoblasten und Osteoblasten hat, der somit zu einem nachfolgenden Anstieg der Knochenbildung führt [Nakamura et al., 1995].

FGF-2 stimuliert die Proliferation verschiedener Zellen wie z.B. muriner osteoblastärer Zellen (MC3T3-E1), verschiedener Krebszelllinien (ROS 17/2.8 Zellen), Osteosarkomzellen und osteogener Zellen, inhibiert aber deren Differenzierung. Dabei zeigen Studien zur Kultivierung osteogener Zellen unter Zusatz von FGF-2 eine Reduzierung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität und der Kollagensynthese [Canalis et al., 1988; Hurley et al., 1994].

1.2.4.3. *Epidermal Growth Factor* (EGF)

Der epidermale Wachstumsfaktor EGF ist ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 6 kDa. Dieser Wachstumsfaktor hat eine positive Auswirkung auf die Replikation von Knochenvorläuferzellen und Osteoblasten, die über spezifische EGF-Rezeptoren verfügen um die Wirkung des Wachstumsfaktors zu vermitteln. Untersuchungen haben gezeigt, dass die EGF-Rezeptoren nicht nur durch Hormone, Wachstumsfaktoren und Vitamine wie z.B. 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ stimuliert werden, sondern auch eine mechanische Stimulation einen positiven Effekt auf die EGF-Rezeptoraktivität osteoblastärer Zellen hat [Ogata et al., 2003].

EGF hat einen mitogenen Effekt sowohl auf Knochenvorläuferzellen als auch auf Osteoblasten und stimuliert deren Proliferation [Ng et al., 1983a; 1983b]. Ihre Differenzierung hingegen wird inhibiert, wobei die Kollagensynthese und Alkalische Phosphatase-Aktivität reduziert werden [Hata et al., 1984; Piche und Graves, 1989; Canalis und Raisz, 1979]. Untersuchungen zur Mineralisierung haben gezeigt, dass EGF die Bildung von mineralisierten *Nodules* zum einen erhöhen zum anderen aber auch verringern kann. In diesem Zusammenhang konnten Studien zeigen, dass während der Differenzierung von osteoblastären Zellen aus Rattencalvarien eine Kurzzeitbehandlung von 4 bis 48 Stunden unter Zusatz von EGF zu einer Steigerung der *Nodules*-Bildung führt, während ein Zusatz über 4 Kultivierungstage die *Nodules*-Anzahl verringert [Antosz et al., 1987]. Die Wirkung des EGF auf die Mineralisierung von Osteoblasten ist damit von seiner Wirkungszeit in der Kultur abhängig [Antosz et al., 1987; Yoneda, 1996].

1.2.4.4. *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF)

Der *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 30 kDa, der in verschiedenen Zelltypen, wie den Monocyten, Myoblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Osteoblasten und auch Tumorzelllinien (Osteosarkom-, Glioblastomzellen) gebildet wird [Heldin und Westermark, 1987]. PDGF stimuliert Fibroblasten und beschleunigt auf diese Weise die Wundheilung [Lynch et al., 1987; Pierce et al., 1991].

Sowohl alleine als auch in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren wie FGF, reguliert PDGF die Knochenbildung *in vivo* [Mayahara et al., 1993; Nakamura et al., 1995]. *In vitro* wird allerdings die Expression von Alkalischer Phosphatase in Osteoblasten sowie die Knochenmatrixbildung durch die Zugabe von PDGF zum Kulturmedium inhibiert [Hock und Canalis, 1994].

Die Gruppe der PDGFs unterteilt sich PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB, die in unterschiedlichen Geweben vorzufinden sind [Hata et al., 1984, Heldin und Westermark, 1987]. Die Wirkung von PDGF-BB wird über die zwei PDGF-Rezeptoren α und β vermittelt. Im Gegensatz dazu binden PDGF-AA und PDGF-AB ausschließlich an den α -Rezeptor. PDGF-BB zeigt im Vergleich mit den beiden anderen Dimeren das höchste stimulatorische Potential und fördert damit die Kollagensynthese sowie die DNA-Replikation in humanen osteoblastären Zellen am effektivsten [Zhang et al., 1991; Kim und Valentini, 1997; Okazaki et al., 1992].

Es bleibt zu erwähnen, dass noch weitere Wachstumsfaktoren in der Lage sind, mesenchymale Stammzellen und Vorläuferzellen des Knochenmarks zu stimulieren. Dazu gehört unter anderem die Gruppe der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die in Osteoblasten gebildet werden. Jedoch sind von den 16 bekannten BMP Faktoren lediglich BMP-2 und BMP-7 nachweislich an der Knochenbildung beteiligt [Trippel et al., 1996]. Da diese in der vorliegenden Arbeit für die Kultivierung nicht verwendet worden sind, wird an dieser Stelle nicht im Detail darauf eingegangen. Zusammenfassend ergeben die oben genannten Faktoren eine Grundlage für eine mögliche Steuerung der Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten *in vitro*. Interessant sind vor allem die Kombinationen dieser Wachstumsfaktoren, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

1.3. Therapiemöglichkeiten zur Knochenheilung

Das Knochengewebe zeichnet sich im Gegensatz zu vielen anderen Geweben durch eine spontane Regenerationsfähigkeit aus. Es gibt jedoch Situationen, in denen diese Spontanheilung nicht ausreichend ist. Wenn der Knochendefekt aufgrund eines Unfalls oder einer Tumorentfernung zu groß ist oder wenn andere Probleme eintreten, wie zum Beispiel mechanische Instabilität als Folge ungenügender Fixierung der Frakturrenden, findet in diesen Fällen diese Regeneration des Knochengewebes nicht statt. Nur durch eine Auffüllung des Defekts im Rahmen eines chirurgischen Eingriffs ist in solchen Situationen eine erfolgreiche Heilung möglich.

Mehr als 2,2 Millionen Knochentransplantationen werden weltweit jedes Jahr durchgeführt. Es gibt beispielsweise in den Vereinigten Staaten jedes Jahr zirka 450.000 chirurgische Eingriffe, die einen Knochenersatz erfordern [Cook et al., 1995]. Dafür stehen mehrere Behandlungsmöglichkeiten zur Knochenheilung zur Verfügung. Zu den operativen Verfahren der Knochenheilung gehört die am häufigsten angewandte autologe Transplantation von Knochen. Hierbei werden Knochen aus einem anderen Teil des Patienten entnommen, um sie in den Defekt einzubringen. Die Vorteile einer autologen Knochentransplantation liegen in der hohen osteogenetischen Potenz und der immunologischen Toleranz gegenüber dem Transplantat, so dass Abstoßungsreaktionen nur in geringer Anzahl vorkommen und gute Heilungsergebnisse erzielt werden. Dennoch birgt dieses Verfahren auch nicht zu vernachlässigende Belastungen, Risiken und Schmerzen für den Patienten, da die Entnahme autologen Gewebes aus dem Patienten einen zusätzlichen Eingriff bedeutet und nicht immer die benötigte Knochenmenge garantiert [Arrington et al., 1996].

Eine andere Alternative stellt die allogene Knochentransplantation von tiefgefrorenem Knochenmaterial aus fremden Spendern dar. Die Transplantate könnten dabei auch prinzipiell aus Kadavern entnommen und bis zu ihrer Verwendung in Knochenbanken gelagert werden. Die Nachteile liegen bei diesem Verfahren in der Gefahr einer Abstoßungsreaktion, einer Infektion durch die Übertragung von nicht erkannten Keimen oder Viren wie z.B. HIV über den Spender und im hohen Aufwand der Knochenbanktechnik [Ehrler und Vaccaro, 2000].

Metalle und deren Legierungen wie z.B. aus Nickel, Kobalt, Chrom, Eisen, Zink und Titan werden auch für die Behandlung von Knochendefekten verwendet. Jedoch

1. Einleitung

werden in diesem Zusammenhang immer wieder Probleme und Nachteile diskutiert. Tatsächlich ermöglichen Metalle eine Fixierung der einzelnen Fragmente, aber sie ermöglichen nicht die knöcherne Integration mit dem umliegenden Knochengewebe, was zu Problemen insbesondere hinsichtlich der mechanischen Festigkeit führen kann. Die Anwendung von Metallen in Knochendefekten kann auch zur Korrosionen führen, die eine Infektion und Schmerzzustände verursachen können.

Die Verwendung von osteokonduktiven Knochenersatzmaterialien (z.B. Calciumphosphat) zählt ebenfalls als therapeutische Alternative zur Knochenheilung. Dabei sollen sich osteogene Zellen an ein Gerüst aus Knochenersatzmaterial anlagern und dort neuen Knochen bilden, wobei hier die oft nicht stattfindende Zellbesiedlung zur angestrebten Knochenneubildung das Hauptproblem darstellt.

Die hier genannten Methoden zur Knochenheilung zeigen Möglichkeiten auf, um Defekte zu regenerieren, wobei jedoch keine dieser Methoden eine ideale Lösung bietet und jeweils spezifische Probleme und Beschränkungen mit sich bringt. An diesem Punkt setzt nun das *Tissue Engineering* an, welches bessere Möglichkeiten bietet die aufgezählten Probleme und Risiken zu umgehen.

1.4. Prinzip des *Tissue Engineering*

Der Begriff des *Tissue Engineering* (TE) beschreibt einen interdisziplinären Bereich, der ein breites Spektrum an Spezialgebieten umfasst z.B. Medizin, Materialwissenschaft, Zellbiologie, Genetik, Biotechnologie und Chemie. Diese neue Technik hat das Potential, Gewebe oder Organe *de novo* herzustellen, wiederherzustellen oder zu verbessern [Thomson et al., 1995]. Das Spektrum des TE umfasst alle im Körper befindlichen Gewebearten. Im Bereich der Gewebeersatztechnik wurden weltweit bereits diverse Möglichkeiten zur Herstellung verschiedenster Gewebe, wie z.B. Haut, Knorpel, Knochen, Gefäße, Herzklappen, Brust und Leber erforscht. Allerdings stehen die Forschung und die Erfolge zur Herstellung von artifizielllem Knochen im Vergleich zu vielen anderen der aufgezählten Gewebe noch deutlich zurück [Minuth et al., 2003].

Das Prinzip des Knochen-TE beruht auf der Entnahme von Knochenmark (oder anderem geeigneten Zellmaterial) im Rahmen einer Biopsie und der Kultivierung der daraus gewonnenen Zellen unter Zusatz von Wachstumsfaktoren und Hormonen *in vitro*. Dabei kann die Differenzierung mit osteogenen Substanzen gesteuert werden.

1. Einleitung

Auf einem biologisch resorbierbarem Trägergerüst „*Scaffold*“ können dann im Anschluss Zellen angesiedelt werden und dem Patienten reimplantiert werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, das besiedelte Trägergerüst in einem Bioreaktor möglichst lang *in vitro* weiter zu kultivieren bevor die Transplantation durchgeführt wird. Diese Methode begünstigt eine Anlagerung von extrazellulärer Matrix [Ishaug-Riley et al., 1997b] sowie eine Anreicherung von Wachstumsfaktoren, welche die osteoinduktiven Eigenschaften des Trägers verstärken. Die Transplantation kann dadurch zu einer deutlichen Verbesserung der Funktionalität oder zur kompletten Heilung des geschädigten Gewebes führen.

1.4.1. Trägergerüste zur dreidimensionalen Zellkultivierung

Zur Behandlung von größeren Knochendefekten werden häufig Trägergerüste verwendet [Ishaug-Riley et al., 1998], da *in vivo-Studien* zeigten, dass transplantierte Zellen ohne Trägermatrix keine heterotope Knochenneubildung induzierten [Goshima et al., 1991].

Physikalische, chemische und kristallographische Eigenschaften des Trägers bestimmen allerdings das Verhalten der Zellen hinsichtlich ihrer Differenzierung und tragen somit zur erfolgreichen Regenerierung und zur Qualität des neuen Knochengewebes bei. Um ein ideales Implantat herstellen zu können, sollte das Gerüst die folgenden Eigenschaften besitzen [Holy et al., 2000a; Shea et al., 2000]:

- hoher Porositätsgrad mit einem Porendurchmesser, der möglichst größer ist als der der Zellen (10 µm)
- große Oberfläche und ein ausreichendes Volumen
- biologisch degradierbar und resorbierbar
- ausreichende mechanische Stabilität
- biokompatibel um ein optimales Gewebewachstum erzielen zu können
- positive Zellinteraktion mit dem Biomaterial (z.B. erhöhte Zelladhäsion, Zellwachstum, Zellmigration und Zelldifferenzierung)
- sterilisierbar (z.B. mittels Gammastrahlung, chemischen Substanzen oder thermisch)
- Langzeitstabilität *in vivo*.

1. Einleitung

All diese Parameter haben einen Einfluss auf die Knochenneubildung. Besonders die Porosität und Porengröße der dreidimensionalen Struktur spielen eine wichtige Rolle. So wird bei Trägermaterialien mit Porengrößen ab 60 µm eine intramembranöse Ossifikation beobachtet, während kleinere Porendurchmesser die enchondrale Ossifikation fördern. Studien von Boyan et al. haben gezeigt, dass Osteoblasten Porengrößen von 200 bis 400 µm bevorzugen, wodurch eine bessere Migration, Anheftung sowie Proliferation der Zellen gewährleistet werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Porengröße, die geringer als 50 µm ist, cytotoxische Effekte verursachen kann [Boyan et al., 1996].

In der klinischen Anwendung werden zur Knochenheilung biologisch abbaubare Materialien eingesetzt. Die am häufigsten experimentell klinisch verwendeten Knochenersatzmaterialien sind abbaubare Polymere, Hydroxylapatit, Tricalciumphosphat sowie Materialmischungen aus Calciumphosphaten und synthetischen Polymeren.

Die Anwendung biologisch abbaubarer Polymere in Bereich des *Tissue Engineering* stellt besondere Anforderungen an diese Materialien. Zum Beispiel werden hierbei die Poly-L-Lactide (*Poly-L-Lactic Acid*, PLLA), Polyglycolide (*Polyglycolic Acid*, PGA) und deren Copolymer (*Poly-L-Lactic-Glycolic Acid*, PLGA) verwendet. Die verwendeten Polymere zeigen ein großes Potential für die Anwendungen im Bereich des Knochen-*Tissue-Engineering*, da Untersuchungen belegten, dass knochenbildende Zellen innerhalb dieser Trägermaterialien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wachsen können [Ishaug-Riley et al., 1997a; Shea et al., 2000].

Neben der großen Vielzahl polymerer Materialien werden auch Calciumphosphatträger, die aus Tricalciumphosphat sowie Hydroxylapatit bestehen, zur Behandlung von Knochendefekten eingesetzt. Die Festigkeit poröser Calciumphosphat-Keramiken ist vergleichbar mit der des spongiösen Knochens. Allerdings liegt ihr Nachteil in ihrer Brüchigkeit, was eine Handhabung *in vitro* als auch *in vivo* erschwert [Mueller und Glowacki, 2000]. Hydroxylapatit (HA; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) wird vorrangig in der Kiefer- und Gesichtschirurgie verwendet [Levine et al. 1997; Koempel et al. 1998]. Es ist resorbierbar, sehr gut biokompatibel in hartem Gewebe und weist eine hohe Osteokonduktivität auf. Die Porosität des Materials spielt bei der Anwendung eine wichtige Rolle, da die Knochenzellen und Blutkapillaren hineinwachsen können müssen um so eine Regeneration des Knochens zu ermöglichen.

1. Einleitung

β -Tricalciumphosphat (β -TCP), das beispielsweise als Biobase[®], BioResorb[®], Cerasorb[®], Fortross[®] und Resorb[®] angeboten wird, findet bereits ebenfalls klinische Anwendung. Träger aus diesem Material sind für die Anwendung im gesamten Skelettsystem zertifiziert und weisen keine Infektionsrisiken auf. Im Vergleich sind Biomaterialien aus β -TCP sogar besser resorbierbar als solche aus HA [Klein et al., 1990; Cuneyt et al., 1997].

Die Nachteile der einzelnen Trägermaterialien, wie sie im vorhergehenden Abschnitt aufgeführt worden sind, lassen sich durch Mischmaterialien korrigieren. So können beispielsweise poröse Mischungen aus HA und β -TCP in ihrer Zusammensetzung je nach Bedarf variiert werden. Mit der Erhöhung des HA-Anteils zum Beispiel könnte somit eine bessere mechanische Stabilität erzielt werden oder die Resorptionsrate durch die Verwendung von mehr β -TCP im Trägermaterial beschleunigt werden. Zahlreiche Untersuchungen dokumentierten, dass Komposite aus HA/ β -TCP *in vitro* bei der Knochenregeneration oder Heilung besser geeignet sind als die Einzelkomponenten [Kwon et al., 2003; Dalby et al., 2000; Ward et al., 1997]. Des Weiteren zeigte sich, dass die Kombination eines elastischen Polymers mit einer brüchigen Calciumphosphatkomponente zu einer höheren Proliferationsrate sowie einer verbesserten osteogenen Differenzierung der Zellen führt. Dies konnte *in vitro* zum Beispiel durch den Einsatz von PGLA/TCP erzielt werden [Arnold et al., 2002]. In der Abb. 1.3 ist ein Kompositmaterial aus HA/TCP als Beispiel dargestellt.

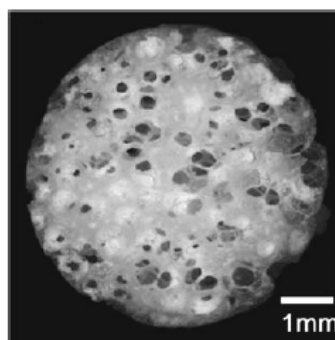


Abb. 1.3. Kompositmaterial aus Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit (HA/TCP) im Verhältnis 60:40 [Zhang et al., 2005].

1.4.2. Durchführung der 3D-Zellkultur

Die Durchführung einer 3D-Kultivierung in Röhrchen, Petrischalen oder in Multiwellplatten reicht nicht aus, um vitale Implantate erforderlicher Qualität herzustellen. In statischer Kultur werden die Zellen im Inneren des porösen Trägers vermindert mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, was zu einem Absterben der Zellen führen kann [Minuth et al., 2003]. Aus diesem Grund wurden spezielle Kultivierungsverfahren in „*Tissue Engineering Bioreaktoren*“, wie z.B. Rollerflaschen- (*rotating wall vessels*) und Spinnerflaschen, entwickelt [Freed und Vunjak-Novakovic, 1995; Qui et al., 1999; Vunjak-Novakovic et al., 1998], um die Nachteile statischer Kultur zu vermeiden.

In den Rollerflaschenkulturen ändert der Träger ständig seine Orientierung gegenüber dem Flüssigkeitsstrom. Im Vergleich dazu wird in Spinnerkulturen das Medium mit Hilfe eines Magneten auf dem Gefäßboden in permanente Rotation versetzt, während der Träger an einem Faden befestigt ist (Abb. 1.4).



Abb. 1.4: Beispiele dreier verschiedener Kultursysteme zur *in vitro* Kultivierung eines Knochenimplantats [Sikavistas et al., 2002].

Durch die Konvektion wird das Medium sowohl in den Spinnerkulturen als auch in den Rollerflaschenkulturen gleichmäßig gut durchmischt, so dass eine partielle Entfernung der Stoffwechselmetabolite aus dem Inneren des Trägers ermöglicht wird. Sikavistas et al. zeigten, dass diese verbesserte Durchmischung der Nährlösung in den Spinnerkulturen im Vergleich zu statischen Kulturen bessere Ergebnisse lieferte, wobei jedoch anzumerken ist, dass die Rollerflaschenkulturen Nachteile hinsichtlich der Gesamtzellausbeute und der Zelldifferenzierung im Vergleich zu den statischen Kulturen aufwiesen [Sikavistas et al., 2002].

Neben diesen Kultursystemen entwickelte Davies et al. ein weiteres dynamisches Kultivierungssystem [Baksh und Davies, 2000]. Das Trägergerüst flotierte dabei in

1. Einleitung

einem zu zwei Drittel mit Medium gefüllten, zylindrischen 50-mL-Röhrchen, dessen exzentrische Rotation für eine gezeitenartige Strömung des umgebenden Nährmediums sorgt. Versuche zur 3D-Langzeitkultivierung (sechs Wochen) von Zellen auf porösen Calciumphosphat-Materialien wiesen dabei deutliche Vorteile gegenüber der statischen Kultur auf.

Bezüglich der Verteilung der Zellen im Biomaterial und deren Proliferation konnte deutlich gezeigt werden, dass im dynamischen System eine gleichmäßigere Besiedlung der Träger gegenüber der statischen Kultur erzielt werden konnte. Dennoch bleibt zu erwähnen, dass in keinem der oben genannten Kultursysteme (statische und Konvektionskulturen) ein kontinuierlicher Austausch des verbrauchten Mediums durch frisches Medium und somit eine Entfernung von Stoffwechselmetaboliten stattfindet.

1.5. Problemstellung und Zielsetzung

Tissue Engineering bietet eine neue Strategie zur Herstellung vom Knochen-implantaten [Vacanti und Langer, 1985]. Viele Faktoren wie z.B. Cytokine, Hormone, sowie ausreichende und kontinuierliche Sauerstoff- und Nährstoffversorgung bestimmen die Qualität des Konstrukts. Man findet in der Literatur zahlreiche Studien, die sich mit der Kultivierung von 3D-Trägern unter dem Einfluss biologischer Faktoren wie z.B. BMPs beschäftigen [Kaito et al., 2005, Saito et al., 2001; Cheng et al., 2003, Kroese-Deutman et al., 2005]. Allerdings ist bis jetzt wenig über den Effekt von Strömungskräften bekannt, die durch Perfusion auf das biologische Verhalten der Zellen innerhalb des Trägers wirken. Bisherige Kultursysteme zur Langzeitkultivierung von Zellen in einer dreidimensionalen Matrix weisen nur unzureichende Leistungseigenschaften auf und machten es notwendig in unserer Arbeitsgruppe ein geeigneteres Perfusionssystem zu entwickeln [Barthold, 2003]. Zudem sollten die Besiedlung und Kultivierung von Trägergerüsten mit osteogenen Zellen des Kaninchens durchgeführt werden. Dieses Tiermodell wurde in Rahmen des EU-Projekts „*Tissue Reactor*“ ausgewählt, da sich in diesem Tier einerseits Knochendefekte einer Größe von 1 cm^3 herstellen lassen und damit eine Implantation von Trägern relevanter Größe erlauben. Andererseits zeigen Kaninchen auch ein dem Menschen recht ähnliches Knochenwachstum [Holy et al., 2000b] und gelten daher als valides Modell für eine spätere Humananwendung. Als Ziel dieser

1. Einleitung

Arbeit sollten die experimentellen Kulturbedingungen für die *in vitro* Herstellung vitaler und funktionaler Implantate etabliert und optimal angepasst werden.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich daher auf folgende Schwerpunkte:

- ✓ Zunächst sollte ein standardisiertes Protokoll zur Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Kaninchen (*rabbit mesenchymal stem cells*; RMSCs) etabliert werden. Anschließend sollten optimale Bedingungen geschaffen werden, um diese Zellen zu vermehren, gezielt zu differenzieren und zur Matrixmineralisierung anzuregen.
- ✓ Des Weiteren sollten Untersuchungen zum Einfluss von speziesspezifischem Serum (Kaninchenserum) auf die Entwicklung der Vorläuferzellen durchgeführt werden, um ein übertragbares Modell auf die Anwendung von autologem humanem Serum zu schaffen und das Risiko von Gewebsabstoßungen bei den geplanten Implantationen in Knochendefekte zu minimieren. Darüber hinaus sollte die Wirkung verschiedener Cytokine bei der Langzeitkultivierung osteogener Zellen in optimiertem Medium beschrieben werden.
- ✓ Zusätzlich sollte die Wirkung einer Perfluorcarbon-Emulsion zum verbesserten Sauerstoffeintrag bei der Kultivierung osteogener Kaninchenzellen getestet werden.
- ✓ Anschließend sollte überprüft werden, ob sich das entwickelte Kultivierungsverfahren auch in ein dreidimensionales System mit neuartigen Trägergerüsten unter Verwendung eines Perfusionsbioreaktorsystems transferieren lässt.

2. Material und Methoden

2.1. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Autoklav (barrel) 83343 Sterilizer	Webeco, Bad Schwartau, Deutschland
Autoklav, Sterilizer	Sauter Moller, Köln, Deutschland
Biocenter Inkubator 2001	Integra, Fernwald, Schweiz
Biochemischer Analysator YSI 2700	YSI, Yellow Springs OH, USA
Elektronenmikroskopie	DSM 982 Gemin, Zeiss, Jena, Deutschland
Elisa-Reader, SLT 340 ATTC	Labinstrument, Crailsheim, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5403	Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzphotometer	Cytofluor 2350 Millipore, Bedford MA, USA
Inkubator Cytoperm2	Heraeus/Kendro, Hanau, Deutschland
Labor pH-Meter, 761 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Mikroskop Nr. 1	Nikon, Yokohama, Japan
Mikroskop Nr. 2	Axioskop, Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Nr. 3	Axiovert 120, Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Nr. 4	ID10, Zeiss, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage BP 3100S Sartorius	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spectrophotometer 3100 pro	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sterilbank	Heraeus/Kendro, Hanau, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraturrax T25 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Vortex-Schüttler, Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad, Type 3042	Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2. Material und Methoden

Verbrauchsmaterialien

Filter AcroCap 0.1 µm	Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor MI, USA
Kryo-Röhrchen, Nalgene	Nalge, Rochester NY, USA
Kulturflaschen 25, 75, 175 cm ²	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Mikrowellplatten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen, 50 mL/10mL	Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA

Chemikalien sowie weitere eingesetzte Materialien und Geräte sind bei den einzelnen Versuchen aufgeführt.

2.2. Isolierung und Kultivierung osteogener Kaninchenzellen

2.2.1. Vorbereitung der Lösungen und Kulturmedien

Phosphat-gepufferte Saline (PBS)

PBS wird als Wasch- und Verdünnungspuffer mit physiologischem pH verwendet. Sie wurde bei 121°C im Autoklav sterilisiert. Die Zusammensetzung der PBS lautet: 150 mmol·L⁻¹ NaCl (Serva, Heidelberg), 8 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄ (Fluka, Buchs, Schweiz), 3 mmol·L⁻¹ KCl (Fluka), 1,5 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ (Fluka), pH 7,4.

Antibiotika

Um die Gefahr von Kontaminationen in der Kultur zu verringern wurde eine gebrauchsfertige Antibiotikastammlösung (100x Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Paisley, Schottland) 10.000 I.E./mL Penicillin, 10 mg·mL⁻¹ Streptomycinsulfat in 0,85%iger Kochsalzlösung) dem Kulturmedium in einer Konzentration von 1% (v/v) zugegeben. Die Lagerung der Antibiotika erfolgte bei -20°C.

Basalmedium

ZKT-I Medium (Pulvermedium, Biochrom, Berlin, Cat Nr. TZ 999-E) wurde in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der GBF entwickelt [Jäger et al., 1988] und für die Kultivierung eingesetzt. Dem Pulvermedium wurden 3,61 g·L⁻¹ Natriumhydrogencarbonat zugesetzt.

2. Material und Methoden

Serum

Zur Supplementierung der Medien wurden zwei Seren benutzt: Fötale Kälberserum (FBS, Gibco BRL, Invitrogen) oder Kaninchenserum (KS, Kreaber, Ellerbek, Deutschland). Die Vorbereitung der beiden Seren folgte demselben Schema: nach Auftauen des Serums bei Raumtemperatur wurde es zur Inaktivierung cytolytischer Proteine des Komplementsystems eine Stunde bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert, anschließend in 50-mL-Röhrchen aliquotiert und bei 4°C gelagert.

Um Proliferation und Differenzierung der Kaninchenprogenitorzellen zu stimulieren wurden dem Basalmedium folgende Substanzen zugegeben:

L-Ascorbat-2-Phosphat

L-Ascorbat-2-Phosphat (Sigma, St. Louis MO, USA) wurde in einer Konzentration von 20 mmol·L⁻¹ in MilliQ-Wasser gelöst und steril filtriert (0,22 µm Millex-Filter, Millipore, Bedford MA, USA). Die Lösung wurde in 50-mL-Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Dem Medium wurde diese Stammlösung in einer Verdünnung von 1:100 (v/v) zugegeben, so dass die Endkonzentration im Medium 0,2 mmol·L⁻¹ betrug.

β-Glycerophosphat

β-Glycerophosphat (Sigma) wurde in einer Konzentration von 1 mol·L⁻¹ in MilliQ-Wasser gelöst, steril filtriert (0,22 µm), in 50-mL-Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Dem Kulturmedium wurde diese Stammlösung in einer Verdünnung von 1:100 (v/v) zugegeben, so dass die Endkonzentration im Medium 10 mmol·L⁻¹ betrug.

Dexamethason

Dexamethason (Sigma) wurde als 10.000fache Stammlösung hergestellt. Diese wurde in einer Konzentration von 0,1 mmol·L⁻¹ in MilliQ-Wasser angesetzt, steril filtriert (0,22 µm), in 10-mL-Falcon Röhrchen aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Die Konzentration im Medium betrug 10⁻⁸ mol·L⁻¹.

2. Material und Methoden

2.2.2. Isolierung von Knochenvorläuferzellen

2.2.2.1. Gewinnung von Kaninchenknochenmark aus Femur und Tibia

Für diese Arbeit wurden weibliche, sechs Wochen alte, New Zealand White Rabbits mit einem Gewicht von ca. 800 g eingesetzt. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratories (Kißlegg, Deutschland) geliefert. Das Töten dieser Tiere ohne Betäubung ist verboten, weshalb der Prozess dem Tierschutzgesetz entsprechend in zwei Schritten durchgeführt wurde:

Anästhesie:

Sechs Wochen alten weiblichen Kaninchen wurde eine Kombination aus Ketamin (Albrecht, Aulendorf, Deutschland / 0,25 mL pro kg Körpergewicht) und Domitor (Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) (0,1 mL pro kg Körpergewicht) intramuskulär in den Oberschenkel injiziert (s. Abb. 2.5).



Abb. 2.5: Intramuskuläre Injektion von Ketamin und Domitor.

Intravenöse Injektion:

Zwischen 3 und 5 Minuten nach der Betäubung, wurden die Tiere durch Injektion einer Überdosis T61 (Hoechst Roussel, Unterschleißheim, Deutschland) in die Ohrvene getötet (s. Abb. 2.6).

2. Material und Methoden



Abb. 2.6: Intravenöse Injektion der T61-Lösung.

Nach Tötung des Tieres wurde es zunächst bäuchlings auf einer mit Aluminiumfolie bedeckten Styropor-Unterlage mit Nadeln fixiert. Nach gründlicher Desinfektion des Fells mit 70% Ethanol und Abdecken mit sterilen Tüchern wurde die Haut entlang der Wirbelsäule und der Oberschenkel- bzw. Unterschenkelknochen aufgeschnitten und seitlich fixiert um eine Kontamination des Muskelgewebes durch Haare zu vermeiden. Das Muskelgewebe wurde dann erneut mit Ethanol desinfiziert und anschließend entlang des Femurs und der Tibia mit einer Schere entfernt ohne die Knochenhaut und Blutgefäße zu verletzen. Zunächst wurde der Femur aus Knie- und Hüftgelenk gelöst ohne die Epiphysen zu entfernen um den Knochen geschlossen und damit aseptisch zu belassen. Danach wurde der Tibia vorsichtig gelöst. Dieser Prozess dauerte ca. 20 Minuten pro Tier. Die entfernten Knochen wurden dreimal für je 5 Minuten in sterile 50-mL-Röhrchen mit 35 mL Waschmedium (ZKT-I, 10% Penicillin/Streptomycin) gegeben und unter einer Sterilbank weiterbehandelt. Die Epiphysen wurden abgeschnitten und der nun offene Röhrenknochen mit Hilfe einer 10-mL-Spritze (Omnifix, B. Braun, Melsungen, Deutschland) und einer aufgesetzten Kanüle (1.00 x 100 mm, Unimed, Lausanne, Schweiz) von beiden Seiten jeweils dreimal mit 10 mL Zellkulturmedium (ZKT-I, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FBS, 0,2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, 10^{-8} M Dexamethason) gespült (s. Abb. 2.7). Die Knochenmarkzellen wurden resuspendiert und nach Bestimmung von Vitalität und Zellzahl auf T175 Flaschen verteilt. Pro Femur und Tibia wurde eine T175 Flasche benutzt. Nach drei Tagen wurde das Medium entfernt und die Kultur dreimal mit 10 mL steriler PBS gewaschen, um die Suspensionszellen zu entfernen. Anschließend wurden die adhärennten Zellen mit frischem Zellkulturmedium versorgt. Zwischen 5 und 7 Tagen nach der Isolierung waren erste

2. Material und Methoden

Kolonien zu erkennen. Mittels eines transparenten, selbstgefertigten Gitters mit 1 cm² großem Raster, das unter die Kulturflasche positioniert wurde, wurden diese unter dem Mikroskop Nr. 4 gezählt.



Abb. 2.7: Isolierung von Knochenmark aus dem Femur und anschließende Suspension in ZKT-I mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin.

2.2.3. Subkultivierung

Kurz vor Erreichen der Konfluenz (5 bis 7 Tage nach der Isolierung) wurden die Zellen passagiert. Das Medium wurde aus der T175 Flasche abgezogen und die adhärennten Zellen vorsichtig dreimal mit warmer PBS gewaschen. Der Zellrasen wurde mit 5 mL Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen) bedeckt und die Zellen nach 5-7 Minuten durch Klopfen vom Boden der T175 Flasche abgelöst. Das Trypsin wurde durch die Zugabe von 5 mL serumhaltigem Medium (ZKT-I, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin) inaktiviert und die Suspension anschließend bei 800·g drei Minuten abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren wurden die Zellen gezählt und in einer Dichte von 10.000 Zellen pro cm² (optimierte Dichte) in T175 oder T75 ausgesät. Die Zellen wurden erneut passagiert, wenn sie ca. 80%-90% Konfluenz erreicht hatten.

2.2.4. Kultivierung der Progenitorzellen in optimiertem Medium

Verwendete Cytokine:

Platelet derived Growth Factor BB (PDGF-BB), *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF-2), *Epidermal Growth Factor* (RELIATech, Braunschweig, Deutschland) und *Insulin-like Growth factor-I* (IGF-I) (Peprotech Rocky Hill NJ, USA) wurden gemäß den mitgelieferten Protokollen rekonstituiert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Cytokine wurden in PBS/1% FBS in einer Konzentration von $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ aliquotiert und anschließend bei -20°C gelagert.

Zur Kultivierung der osteogenen Kaninchenzellen im optimierten Medium wurden zum Basalmedium ZKT-I: 1% FBS, 1% Pen/Strep, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Humantransferrin (Biotest, Dreieich, Deutschland), $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Rinderinsulin (Gibco), $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Albumax I (Gibco), 0,2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, 10^{-8} M Dexamethason und jeweils $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PDGF-BB, EGF und FGF-2 zugegeben.

2.2.5. Einfrieren von Zellen

Der zu ca. 80% konfluente Zellrasen wurde zunächst mit PBS gewaschen und dann mit Hilfe von Trypsin-Lösung abgelöst. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in Einfriermedium (10% ZKT-I, 10% DMSO (Sigma), 80% FBS) aufgenommen und in Einfrier Röhrchen verteilt. Anschließend wurden die Röhrchen in einer Kryobox (Abkühlgeschwindigkeit $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, Nalgene Freezing Container, Nunc Nalge, Rochester NY, USA) verpackt und über Nacht bei -70°C gelagert. Nach 12 Stunden können die eingefrorenen Zellen in der Dampfphase über flüssigem Stickstoff langfristig gelagert werden.

2.2.6. Auftauen von Zellen

Das Kulturmedium wurde zunächst auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und sofort in eine vorgekühlte Kryobox (Nalgene) überführt. Die Zellen wurden bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut. Danach wurden sie in 5 mL Medium (ZKT-I, 1% Pen/Strep, 10% FBS, 0,2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, 10^{-8} M Dexamethason) aufgenommen und bei 800-g drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in

2. Material und Methoden

vorgewärmten Zellkulturmedium aufgenommen. Nach der Bestimmung von Zellzahl und Vitalität wurden die Zellen je nach Dichte in eine geeignete Zellkulturflasche überführt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.7. Populationsverdopplungszeit

Die Verdopplungszeit (2) wurde aus der Formel (1) berechnet:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

Verdopplungszeit t:

$$t = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

Die exponentielle Wachstumsrate μ wurde aus der Formel (1) berechnet:

$$\mu = \frac{\ln(X) - \ln(X_0)}{t - t_0} \quad (3)$$

t: Zeit [s]

t_0 : Zeit zum Zeitpunkt t=0 [s]

X: Zellkonzentration zum Zeitpunkt t [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]

X_0 : Zellkonzentration zum Zeitpunkt t=0 [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]

μ : spezifische Wachstumsrate [s^{-1}]

2.3. Analytische Methoden

2.3.1. Parameter zur Überprüfung der Zellproliferation

2.3.1.1. Zellvitalitätsbestimmung mittels WST-1-Test

Bei dem WST-1 Test von Roche handelt es sich um einen kolorimetrischen Vitalitätstest. Der WST-1-Test ist ein etabliertes Verfahren zur Messung der Proliferationsaktivität einer Zellkultur. Er beruht darauf, dass ein Tetrazoliumsalz durch zelluläre Enzyme (die Elektronentransportkette des mitochondrialen Succinat-Reduktase System) zu Formazan umgesetzt wird. Durch Zunahme der Anzahl lebender Zellen kommt es zu einer Zunahme der aktiven mitochondrialen Dehydrogenase bzw. zu einer Zunahme der Menge an farbigem Formazan, welche innerhalb vorgegebener Grenzen direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen in der Kultur ist. Die gebrauchsfertige WST-1-Lösung wurde dem vorgewärmten Kulturmedium im Verhältnis 1:10 zugesetzt. Das verbrauchte Medium

2. Material und Methoden

wurde abgesaugt und durch 200 µL des mit WST-1 versetzten Mediums ersetzt. Nach einer für Kaninchenosteoblasten ermittelten optimalen Inkubationszeit von drei Stunden konnte die Bildung des roten Formazans durch Messung der Absorption bei 450 nm gegen einen Blindwert mittels eines ELISA-Readers bestimmt werden.

2.3.1.2. Glucose/Lactat-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration von Kulturüberständen wurde ein Glucose/Lactat-Analysator benutzt. Das Gerät ist mit einer internen Kalibrierung ausgestattet. Die Messung beruht auf einem enzymatisch-elektrochemisch gekoppelten Prozess. Dabei wird das von den immobilisierten Enzymen Glucose- und Lactatoxidase gebildete H_2O_2 an einer Pt/AgCl/Ag Elektrode amperometrisch gemessen. Die Messungen wurden dreimal durchgeführt und davon ein Mittelwert ermittelt.

2.3.1.3. Gesamtproteinbestimmung mittels Micro-BCA-Methode

Der Gesamtproteingehalt der Zellen in der Kultur wurde mit Hilfe des Micro-BCA Protein Assay Reagenz Kit (Pierce, Rockford IL, USA) bestimmt. Das Prinzip der Methode beruht auf der Reduktion von Cu(II) (grün) in Gegenwart von Proteinen unter alkalischen Reaktionsbedingungen zu Cu(I). Es bildet sich ein violetter Cu(I)-Bicinchoninsäurekomplex, dessen Absorption bei 570 nm vermessen wurde [Smith et al., 1985].

Das Färbereagenz besteht aus den drei Komponenten A, B und C im Verhältnis von 25:24:1. Lösung A ist eine wässrige Lösung von Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumtartrat und 0,2 M Natriumhydroxid. Lösung B ist eine 4%ige wässrige BCA-Lösung und Lösung C ist eine 4%ige Lösung von Kupfersulfat-Pentahydrat in Wasser.

Die Durchführung der Methode erfolgte in 96-Well-Platten. Dazu wurden 150 µL Proben oder Standards mit 150 µL Färbereagenz vorsichtig vermischt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend die Absorption im ELISA-Reader bei 570 nm vermessen.

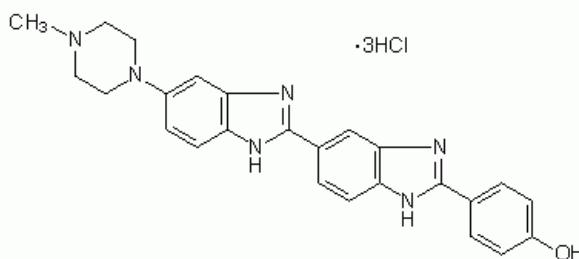
Vor der Durchführung der Micro-BCA-Proteinbestimmung wurden die Zellen in 48-Well-Platten mit 200 µL Lysispuffer (2% Triton X-100, 50 mM Hepes, 100 mM NaCl) über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Lysat vorsichtig ohne

2. Material und Methoden

Schaumbildung durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Mikroliterpipette homogenisiert und in die Microtiterplatte überführt. Die Eichkurve wurde mittels einer Verdünnungsreihe des Proteinstandards BSA (Bovines Serumalbumin, 1 mg BSA/mL in 0,15 M NaCl, Sigma) erstellt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.3.1.4. Zellzahlbestimmung mittels Hoechst 33258 Fluoreszenzfärbung

Die Zellzahlbestimmung von Osteoblasten des Kaninchens erfolgte durch den Fluoreszenzfarbstoff bis-Benzimide 33258 (Hoechst 33258; Serva, Heidelberg, Deutschland). Der Farbstoff dringt durch die Membranen toter Zellen in den Zellkern ein, wo er irreversibel an die DNA bindet, seine Fluoreszenz kann mit dem Fluoreszenzphotometer (Emission/Absorption: 350/455 nm) vermessen werden.



Bis-Benzimide 33258

Diese Methode war besonders gut geeignet bei der Zellzahlbestimmung in Trägermaterialien da die Zellzahlbestimmung mittels Hämocytometer nach einem Trypsinverdau kein zufriedenstellendes Ergebnis lieferte. Alle Proben wurden erst mit warmer PBS gewaschen und in PBS bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

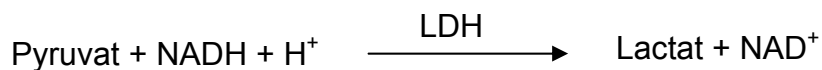
Nach dem Auftauen der Proben wurde die PBS mit einer Pasteurpipette entfernt. Die Proben wurden mit 1,4 mL kalter Natriumphosphatlösung (0,1 M Na₃PO₄, 1,9 M NaCl) überschichtet. Anschließend wurden die besiedelten Gerüste bei 13.000 UPM für 1 Minute im Ultraturrax homogenisiert und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1,0 M Phosphorsäure wurde der Überstand auf pH 7,0 eingestellt. Danach wurde 1,5 mL kalte Hoechst 33258-Lösung (200 ng·mL⁻¹ in 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,0) zupipettiert und kurz auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Dann wurden sechsmal je 200 µL des Homogenisats in die Vertiefungen einer 96-Wellplatte pipettiert und mit einem Fluoreszenzphotometer (Emission/Absorption:

2. Material und Methoden

350/455 nm) vermessen [Arnold et al., 2002]. Die Zellzahl wurde aus den so erhaltenen Absorptionswerten ermittelt, in dem sie mit einer Eichgerade bekannter Zellzahlen ($1 \cdot 10^7$; $5 \cdot 10^6$; $1 \cdot 10^6$; $5 \cdot 10^5$; $1 \cdot 10^5$; $5 \cdot 10^4$; $1 \cdot 10^4$; $5 \cdot 10^3$; $1 \cdot 10^3$) verglichen wurde. Als Nullkontrolle wurde das Trägermaterial ohne Zellen mitgeführt.

2.3.2. Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität

Das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) im Kulturüberstand wurde als messbarer Parameter für die Quantifizierung toter Zellen genutzt. Die Bestimmung der LDH-Aktivität wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers bestimmt. Das Testprinzip basiert auf der folgenden Reaktion:



Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch die Messung der NADH-Abnahme. Zur Bestimmung des LDH-Gehaltes wurden erst 60 μL Proben mit 420 μL Puffer (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris/HCl) und 60 μL Substrat (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pyruvat) vermischt und für 25 Minuten bei 37°C vorgewärmt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 60 μL 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADH zur Probe gegeben und mit einem Kinetikphotometer bei 430 nm gemessen. Überstände wurden maximal 4 Tage bei 4°C gelagert und dann gemeinsam vermessen. Als Nullkontrolle wurde das eingesetzte Kulturmedium mitgeführt. Es wurde bei jeder Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.3.3. Trypanblauausschluss zur Zellzählung

Die Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblaulösung (0,9 g NaCl, 0,5 g Trypanblau (Merck)) in 100 mL Wasser gelöst) durchgeführt. Dazu wurden die Zellsuspensionen je nach Konzentration 1:1 oder 1:2 mit der Trypanblaulösung vermischt. Die Anzahl lebender und toter Zellen wurde durch Auszählung mittels einer verbesserten Neubauer Zählkammer (Neubauer improved, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm^2 , Assistent Glasswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland) unter dem Mikroskop Nr. 3 bestimmt. Der Farbstoff färbt dabei tote Zellen selektiv an, weil er durch die geschädigte Zellmembran in die Zellen eindringen kann [Walford et al., 1964].

2. Material und Methoden

2.3.4. Parameter zur Überprüfung der Differenzierung der Zellen

2.3.4.1. Alkalische Phosphatase (AP)

Alkalische Phosphatase ist ein weitgehend anerkannter Proteinmarker von Osteoblasten. Dabei handelt es sich um ein membranständiges Enzym, das nach einer bestimmten Zeit von der Membran abgelöst wird und so *in vivo* in die Blutzirkulation bzw. *in vitro* in den Überstand der Kultur gelangt [Christenson, 1997]. Während die membrangebundene Alkalische Phosphatase gut für histologische Färbungen herangezogen werden kann, ist für ihre quantitative Bestimmung ein Abbruch der Kultur notwendig (s.u.). Über die Quantifizierung der löslichen Alkalischen Phosphatase steht eine alternative, nicht-invasive Methode zur Verfügung, die es speziell in 3D-Kulturen erlaubt Aussagen über den Differenzierungsgrad der Zellen zu machen.

Die Quantifizierung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase erfolgte durch Umsetzung des farblosen Substrats para-Nitrophenylphosphat (pNPP, Sigma) zum gelb gefärbten Nitrophenol, dessen Absorption bei 405 nm in einem ELISA-Reader gemessen wurde. Die Umrechnung in Units ($1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} = 16,67 \text{ nkat}$) erfolgte anhand einer Eichgerade, die mit aufsteigenden Nitrophenol-Konzentrationen (Merck, Darmstadt) erstellt wurde.

Bestimmung der membrangebundenen AP

Das Kulturmedium einer 48-Well-Platte wurde vollständig abgezogen und nach zweimaligem Waschen des Zellrasens mit warmer PBS, wurden 200 μL pNPP-Reaktionslösung zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 μL abgenommen, in eine 96-Lochplatte überführt und bei 405 nm im ELISA-Reader vermessen. Als Nullkontrolle wurden 200 μL pNPP-Reaktionslösung ohne Zellen zugegeben und entsprechend behandelt.

Bestimmung der löslichen AP

Um die lösliche AP im Kulturüberstand bestimmen zu können, wurden jeweils 200 μL Probe bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Nach dem Auftauen der Probe bei RT wurde diese in 3 Aliquots zu je 20 μL in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte gegeben. Dazu wurden je 200 μL der pNPP-Reaktionslösung pipettiert und die Platte auf einem Thermomixer bei 400 UPM für 30 sek. geschüttelt. Anschließend wurden

2. Material und Methoden

die Proben aus 2D-Kulturen für 24h oder aus 3D-Kulturen bis zu 48 Stunden bei 37°C inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader vermessen. Als Nullkontrolle wurde zellfreies Kulturmedium demselben Verfahren unterzogen.

2.3.4.2. Osteocalcinbestimmung mittels ELISA

Zur Bestimmung des Knochenmarkers Osteocalcin (OC) im Kulturüberstand wurde ein Immunoassay (Gla-type Osteocalcin EIA, Takara Bio Europe, Gennevilliers, Frankreich) durchgeführt. Es ist zu vermuten, dass Osteocalcin im Kulturüberstand sehr instabil ist, weshalb die Proben schnell entnommen, aliquotiert und bei –70 °C gelagert wurden.

Gla-OC EIA ist ein Zweischnitt-ELISA nach dem Sandwich-Prinzip. In die Vertiefungen der ELISA Teststreifen, die mit einem monoklonalen Mausantikörper beschichtet waren, wurden 100 µL Proben bzw. die Kontroll- oder Standardlösungen gegeben und bei RT zwei Stunden inkubiert. Danach wurden unspezifische Probenbestandteile in einem Waschschnitt (3x 400 µL PBS) entfernt. Dann wurden 100 µL eines zweiten POD-konjugierten monoklonalen Mausantikörpers zugegeben und wiederum für eine Stunde inkubiert. In einem weiteren Waschschnitt (4x 300 µL PBS) wurde ungebundenes Konjugat entfernt. Anschließend wurden 100 µL Substratreagenz in jede Vertiefung pipettiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert, wobei die Peroxidase des Konjugats mit dem Substrat Wasserstoffperoxid Tetramethylbenzidin (TMB) zu einer blau gefärbten Substanz oxidiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stopplösung (1N H₂SO₄) gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Über eine Standardkurve wurde die Osteocalcinkonzentration in der Probe quantitativ bestimmt. Als Nullkontrolle wurde zellfreies Kulturmedium mitgeführt. Für alle Standards, Nullkontrollen und Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.3.5. Parameter zur Überprüfung der Mineralisierung

2.3.5.1. Bestimmung der Calciumablagerung in der extrazellulären Matrix

Um die Quantifizierung des extrazellulären Calciums der mineralisierenden Zellen zu bestimmen wurde die Methode von Hale et al. benutzt [Hale et al., 2000]. Das Testprinzip beruht auf der Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen Calcein (Sigma) und in die extrazelluläre Matrix eingelagerten Calciumphosphaten. Der fluoreszierende Calcein/Calcium-Komplex wurde durch Licht der Wellenlänge 485 nm (Streubreite des Filters: 20 nm) angeregt und emittiert nachfolgend Licht der Wellenlänge 530 nm (Streubreite des Filters: 25 nm). Anregung und Absorption erfolgten während der Messung im Fluoreszenzphotometer.

Nach zweimaligem Waschen der fixierten Zellen mit sterilem Wasser wurden diese mit Calceinfärbelösung ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Calcein in H_2O) überschichtet und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Danach wurde der Zellrasen zweimal mit Wasser gewaschen und im Fluoreszenzphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm vermessen. Die Bestimmung erfolgte in 48-Well-Platten, wobei nur eine relative Zu- oder Abnahme der Menge des extrazellulären Calciums bestimmt werden könnte. Daher wurde immer eine Nullkontrolle (ohne Zellen) auf der zu vermessenden Platte mitgeführt.

2.4. Rasterelektronenmikroskopie

Für die detaillierte Untersuchung der Zellen in den Trägergerüsten (Morphologie, Verteilung, Ausbildung der extrazellulären Matrix) wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM oder scanning electron microscopy) eingesetzt. Dabei wird die Oberfläche der Probe mit einem Elektronenstrahl abgerastert.

2.4.1. Probenvorbereitung

Durch starken Wasserverlust könnten Strukturartefakte entstehen, deren Bildung durch Glutaraldehydfixierung vorgebeugt wird. Hierzu wurden die besiedelten Träger zunächst dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Glutaraldehyd-Lösung (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) in Cacodylatpuffer (Merck, 2,5% (v/v) Glutaraldehyd) überschichtet und bei 4°C inkubiert. Nach Absaugen der Fixierlösung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

2. Material und Methoden

Zur Durchführung der Mikroskopie wurden die spröden CAMCERAM® Gerüstträger zuerst an der Oberfläche angeschnitten und anschließend in der Mitte durchgebrochen. Die Entwässerung erfolgte stufenweise nach folgendem Schema:

10% Aceton, 15 min, 4°C

30% Aceton, 15 min, 4°C

50% Aceton, 15 min, 4°C

70% Aceton, 15 min, 4°C

90% Aceton, 15 min, Raumtemperatur

3 mal 100% Aceton, 15 min, Raumtemperatur

Anschließend wurde das Aceton durch eine Kritisch-Punkt-Trocknung mit CO₂ entfernt und die Zellen mit Gold bedampft.

2.5. Histologische Methoden

2.5.1. Fixierung der Zellen mittels Ethanol

Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und dreimal mit PBS gewaschen, danach wurde die gleiche Menge an kaltem 100% EtOH zugegeben und dreißig Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das EtOH entfernt und der Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen. Die fixierte Kultur wurde mit PBS überschichtet und bei 4°C gelagert.

2.5.2. Fixierung mittels 4% Paraformaldehyd

Zur Herstellung einer 4% Paraformaldehyd-Lösung wurden 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA, Fluka, Buchs, Schweiz) in PBS gegeben und bei 55°C mindestens eine Stunde gerührt. Die klare Lösung wurde unter Eiswasser abgekühlt und über ein Faltenfilter filtriert. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Fixierung wurden die Zellen in der Kultur dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die 4% PFA-Lösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die fixierten Zellen bei 4°C in PBS/ 0,01% NaN₃ gelagert.

2. Material und Methoden

2.5.3. Gesamtkollagenfärbung

Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert (Fixierungslösung: 95% v/v Ethanol, 5% v/v Essigsäure). Nach dreimaligem Waschen der fixierten Zellen mit PBS wurden die Zellen 30 Minuten mit Färbelösung (0,1 g Direkt Rot 80 (Fluka; Prod. Nr. 43665) bedeckt und überschüssiges Färbereagenz dreimal mit MilliQ-Wasser ausgewaschen.

2.5.4. Sudan III-Färbung von Adipocyten

Die Sudan III-Färbung ist die gebräuchlichste Methode um Fettzellen zu färben. Das Färbeprinzip beruht auf der Löslichkeit des Farbstoffs in den Lipidvakuolen von Fettzellen.

Herstellung der Sudan III-Lösung:

1. Stammlösung: 0.5 g Sudan III (Sigma) in 100 mL 99%igen Isopropanol lösen.
2. Gebrauchslösung: 6/4 (v/v) Sudan III-Stammlösung /Milli-Q-Wasser filtrieren (0,2 µm-Filter, Millipore).

Die mittels 4% PFA fixierten Zellen (s. 2.5.2) wurden zunächst mit PBS und danach einmal mit 60%iger Isopropanol-Lösung (2 Minuten) gewaschen und dann mit Sudan III-Gebrauchslösung für 15-30 Minuten gefärbt. Anschließend nach dem Abziehen der Sudan III- Gebrauchslösung, wurden die Zellen mit 60%iger Isopropanol-Lösung gewaschen und mit PBS überschichtet. Die Farbtöne der Färbung reichen von gelbrot bis rot. Dies ist nicht auf die Inhomogenität des Farbstoffpräparates zurückzuführen sondern ist von den Konzentrations-Unterschieden des Farbstoffes in den Zellen abhängig.

2.5.5. Calciumnachweis nach von Kossa

Eine Standardmethode zum Nachweis ungelöster Calciumsalze im Knochengewebe oder mineralisierter Kultur ist der Methode nach von Kossa. Dabei wird das Calcium in der extrazellulären Matrix gegen Silberionen ausgetauscht, die anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Die Färbung wurde in einer modifizierten Form nach [Chaplin et al., 1975] durchgeführt.

2. Material und Methoden

Zur Herstellung der Silbernitratlösung wurden 5% (w/v) AgNO_3 (Merck) in Milli-Q-Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung filtriert und unter Lichtabschluss aufbewahrt. Die Natriumcarbonatlösung wurde aus 5 g Na_2CO_3 (Merck) in 200 μL Formaldehyd und 100 mL H_2O angesetzt.

Die in 4%iger PFA-Lösung fixierten Zellen (s. 2.5.2) wurden mit sterilem Wasser gewaschen, mit Silbernitratlösung bedeckt und unter Lichtabschluss für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und durch Zugabe von Natriumcarbonatlösung erfolgte innerhalb von einer Minute die Reduktion, die durch Waschen mit Wasser gestoppt wurde. Calciumablagerungen in der extrazellulären Matrix färben sich durch die Reduktion des Silbers je nach Stärke der Mineralisierung braun bis schwarz.

2.5.6. Alkalische Phosphatase-Färbung (AP)

Die Färbung membrangebundener AP wurde mittels NBT/BCIP (Nitroblau Tetrazolium/5 Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) durchgeführt. Die Methode beruht auf einer Reaktion zwischen den beiden farblosen Komponenten NBT und BCIP, die durch die membranständige AP katalysiert wird. In deren Verlauf wird ein braunschwarzer Niederschlag gebildet. Die Färbelösung (NBT/BCIP-Tablette; Roche, Mannheim) wurde in 10 mL Wasser gelöst und bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

Die mit 4%iger PFA-Lösung fixierten Zellen wurden mit Wasser gewaschen und mit der Färbelösung überschichtet. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Absaugen der Färbelösung und dreimaliges Waschen mit sterilem Wasser gestoppt.

2.5.7. Vitalitätstest

Der „Viability/Cytotoxicity-Test“ (Molecular Probes, Eugene OR, USA) ist eine einfache Fluoreszenz-basierte Methode für die Identifizierung lebender Zellen. Dabei wird der Farbstoff Calcein (ein fluorogenes Esterasesubstrat) an die intakte Membran lebender Zellen gebunden und mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Zur Durchführung der Methode wurden die Zellen in Kultur zunächst mit PBS gewaschen und 5 Minuten bei 37°C mit 200 μL 2 μM Calcein-AM

2. Material und Methoden

(Acetoxymethylester des Calceins) in 4 mL PBS inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde die Färbung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beurteilt.

2.5.8. Paraffineinbettung von Osteoscaf Trägern

Die zu untersuchenden Trägermaterialien können auf verschiedene Weise für eine histologische Untersuchung vorbereitet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Paraffin-Einbettung gewählt. Die aufwendigere Vorbereitung wird durch die bessere Strukturhaltung von Zellen und Matrix - insbesondere in Kombination mit dem Osteoscaf-Träger - gerechtfertigt. Damit die Architektur des Trägers möglichst natürlich erhalten bleibt, musste eine Fixierung durchgeführt werden. Die Träger wurden vorsichtig dreimal mit PBS gewaschen, mit frisch eingesetzter PFA-Lösung (s. 2.5.2) in eine 24-Well-Platte überführt und für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Träger dreimal mit PBS gewaschen und bis zur Paraffineinbettung bei 4°C in PBS/ 0,01% NaN₃ gelagert.

Zur Durchführung der Paraffineinbettung wurde der Träger in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert:

5 min	10% Ethanol
5 min	20% Ethanol
5 min	30% Ethanol
5 min	40% Ethanol
5 min	50% Ethanol
5 min	60% Ethanol
5 min	70% Ethanol
5 min	80% Ethanol
2 x 10 min	90% Ethanol
2 x 10 min	95% Ethanol
2 x 10 min	100% Ethanol

Danach wurde der Träger zweimal für jeweils 30 Minuten in Citrisolv-Lösung (Fisher Scientific, Pittsburgh PA, USA) getaucht und dann in Paraffin bei 65°C (Leika EG 1110, Lussloch, Deutschland) über Nacht eingebettet. Der Träger wurde anschließend in heißes Paraffin in einer Kassette getaucht. Das Aushärten des

2. Material und Methoden

Blockes erfolgte innerhalb von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde er bis zum Schneiden bei 4°C gelagert.

2.5.9. Anfertigung von Trägerschnitten

Um die Schnitte vorzubereiten wurde ein Mikrotom (Leika RM 2135) benutzt. Die Schnittdicken lagen bei etwa 5 µm. Sie wurden vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette bei 42°C in einem Wasserbad (Leika HI 1210) gestreckt und auf einen Objektträger (76 x 26 mm SuperFrost, Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Die Objektträger wurden so vorbereitet, dass ein starkes Haften des Schnittes an den Objektträger gewährleistet wurde. Deshalb wurden die Objektträger vorher mit etwa 500 µL Poly-L-Lysine-Lösung (Sigma) beschichtet. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Schnitte im Trockenschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 56°C innerhalb von zwei Stunden.

2.5.10. Färbung der Trägerschnitte

Um die Trägerschnitte färben zu können, wurden zuerst die Objektträger auf 42°C vorgewärmt um das Paraffin aufzulösen, danach wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

5 min	Neo-Clear (Merck, Deutschland)
2 x 5 min	100% Ethanol
5 min	90% Ethanol
5 min	80% Ethanol
5 min	50% Ethanol
5 min	10% Ethanol
2 x 5 min	100% MilliQ-Wasser

Anschließend wurde der Träger je nach Färbemethode gefärbt (s. 2.5.10.1 und 2.5.10.2).

2.5.10.1. DAPI-Färbung

Um eine DAPI-Färbung (Roche; 1 µg·mL⁻¹ in H₂O) durchzuführen, wurden die Probe bzw. die Schnitte zuerst mittels eines Marker Stiftes (Pap Pen, G. Kisker, Steinfurt, Deutschland) umkreist damit die Lösung nicht aus dem markierten Bereich des

2. Material und Methoden

Objektträgers läuft. Nach der Zugabe der DAPI-Lösung für 10 Minuten in Dunkelheit, während dessen der Fluoreszenzfarbstoff mit der Zell-DNA interagiert, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit sterilem Wasser überschichtet. Anschließend wurden die angefärbten Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 351 nm beurteilt.

2.5.10.2. Hematoxylin/Eosin-Färbung von Osteoscafschnitten

Um die Zellen im Trägergerüst analysieren zu können, wurde die H/E (Hämatoxylin/Eosin) Färbung benutzt. Zur Durchführung der Färbung wurden die Schnitte zunächst eine Minute in Hämatoxylin (Merck) eingetaucht. Nach mehrmaligem Waschen mit MilliQ-Wasser wurde der Träger anschließend für 10 Sekunden mit Eosin (Merck) gefärbt. Schließlich wurden 300 µL Kaiser Glycingelatine (Merck) auf den Objektträger aufgezogen und mit einem Deckglas (24 x 50 mm, Menzel Gläser) bedeckt. Die Färbung wurde unter dem Mikroskop Nr. 2 beurteilt.

2.6. 3D-Zellkulturen

2.6.1. Verwendete Trägermaterialien

2.6.1.1. Calciumphosphat (CAMCERAM®)

CAMCERAM® Calciumphosphatträgergerüste (CAM Implants, Leiden, NL) bestehen aus β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und Hydroxylapatit (HA) im Verhältnis 1:1. Die Träger haben eine kubische Form (Größe: 0,95 x 1 x 1 cm) mit einem Gewicht von etwa 0,25-0,28 g. Die Porosität des Keramikmaterials liegt bei etwa 90%. Die interkonnektierenden, sphärischen Poren haben einen Durchmesser zwischen 700 und 900 µm. Die Mikroporendurchmesser liegen unter ca. 50 µm. Die Oberfläche der Trägergerüste liegt bei 0,04 m²·g⁻¹ (B. Schnitter, Mnemoscience, Aachen, Deutschland, persönliche Mitteilung). Die Sterilisation der CaP-Materialien erfolgte durch fünfstündige Inkubation bei 180°C im Trockenschrank.

2. Material und Methoden

2.6.1.2. PLGA/CaP (Osteoscaf)

Osteoscaf (Bone Tec, Toronto, Canada, Batch # 200206. M06/07, 20002, PLGA 75/25 IV/33 dUg, 11,5% CaP/PLGA) besteht aus dem Copolymer Poly-lactidglycolid und (β -Tricalciumphosphat/Hydroxylapatit) im Verhältnis vom 1:2. Die Porosität des Trägers liegt bei 90%. Seine Porenstruktur ist durchgängig interkonnektierend. Der Durchmesser der Makroporen liegt zwischen 100 und 700 μm , die Mikroporendurchmesser liegen unter ca. 100 μm (B. Schnitter, Mnemoscience, Aachen, Deutschland, persönliche Mitteilung). Die zylindrischen Trägergerüste haben einen Durchmesser von 0,97 cm und eine Höhe von 1,04 cm. Das Gewicht des Trägers liegt bei ca. 0,1042 g.

Zur Sterilisation wurden die Osteoscaf Trägergerüste einmal mit sterilfiltriertem Ethanol p.A. (100%) innerhalb einer Minute gewaschen. Danach wurden sie mit sterilfiltriertem 70%igem Ethanol für 10 min gewaschen. Um das Ethanol zu entfernen wurden sie dreimal mit PBS gespült. Anschließend wurden die sterilen Träger über Nacht in Kulturmedium im Brutschrank bei 37°C und 12,5% CO₂ inkubiert.

2.6.2. Dynamisches 3D-Kultivierungssystem

Für diese Arbeit wurde das dynamische 3D-Kultivierungssystem, welches in der Universität Toronto entwickelt wurde [Baksh und Davies, 2000], modifiziert, neu aufgebaut und als relativ simples Referenzsystem für die 3D-Kultur im Bioreaktor (Abb.2.8) verwendet. Dabei wurde das Trägergerüst in einem Halterahmen (aus Edelstahlprüfsiebgebe, Omnilab Bremen, Deutschland) fixiert und in die Mitte eines 50-mL-Röhrchens mit Belüftungskappe (Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) platziert (s. Abb. 2.9).

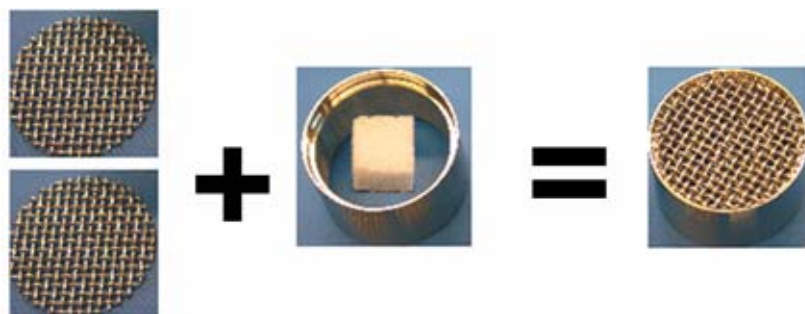


Abb. 2.8: Halterahmen aus Edelstahl, für die Aufnahme von Trägergerüsten, in diesem Fall ein CAMCERAM® Würfel.

2. Material und Methoden

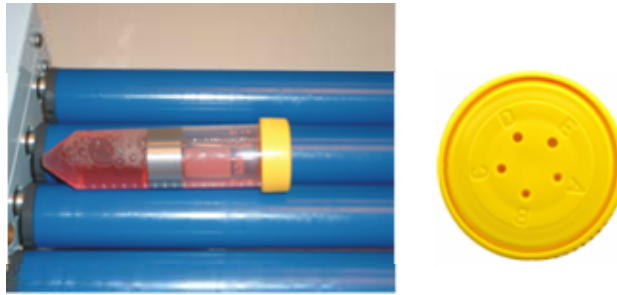


Abb. 2.9: Das dynamische 3D-Kultivierungssystem: Das Trägergerüst im Halterahmen wurde in ein 50 mL-Röhrchen eingebaut. Der Gasaustausch wurde durch eine Belüftungskappe (s. Abb. 2.9, rechts), versehen mit fünf Bohrungen unterschiedlicher Durchmesser (A, B, C, D und E) und einem Gas-durchlässigen Sterilfilter, ermöglicht. Das mit 30 mL Kulturmedium gefüllte Röhrchen wurde auf einen Kipproller gelegt.

2.6.2.1. Kulturführung im dynamischen 3D-Kultivierungssystem

Zur Sterilisation wurden die Einzelteile des Halterahmens für 30 Minuten autoklaviert. Mit Hilfe einer sterilen Pinzette wurde das besiedelte Trägergerüst in den Halterahmen eingebaut und anschließend in ein 50-mL-Röhrchen eingebracht. Die mit jeweils 30 mL Medium befüllten Röhrchen wurden auf einen Stuart SRT 1 Kipproller (200 x 500 x 90 mm B/D/H, Barloworld Scientific, Stone, Großbritannien) gelegt. Das Gerät erzeugte eine gleichmäßige und äußerst wirksame Walz- und Schüttelwirkung. Die exzentrisch aufgehängten Walzen drehten sich mit einer festgelegten Geschwindigkeit von 33 UPM und wurden dabei um 16 mm angehoben und abgesenkt so dass das Kulturmedium gezeitenartig hin und her bewegt wurde und das mit Zellen besiedelte Trägergerüst umspülte. Die Kultivierung wurde in einem Begasungsbrutschrank (Biocenter 2001, Salvis, Reussbühl, Schweiz) bei 37°C und 12,5% CO₂ durchgeführt (s. Abb. 2.10).



Abb. 2.10: Dynamische 3D-Kultur im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 12,5% CO₂.

2.6.3. Das Bioreaktorsystem

2.6.3.1. Prinzip des Bioreaktors

Zur Kultivierung von Knochenvorläuferzellen auf dreidimensionalen porösen Trägergerüsten wurde das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Bioreaktorsystem mit kontinuierlicher Perfusion verwendet. Das Reaktorsystem wurde von der Firma Meredos (Bovenden) angefertigt. Als Reaktorgefäß dient ein Doppelmantelglasgefäß mit konischem Innenteil und 30 mL Arbeitsvolumen. Im Zentrum dieses Gefäßes befindet sich der Trägergerüsthälter zur Aufnahme eines zylindrischen oder kubischen Trägergerüstes von ca. 1 mL Volumen. Der Halter ist über ein Metallrohr mit einem Innendurchmesser von 3 mm an der Reaktordeckelplatte befestigt. Über das Metallrohr und einen Pumpenschlauch wird mit Hilfe einer peristaltischen Umwälzpumpe (HP-90, Meredos, Abb. 2.11, 3) Nährmedium durch das besiedelte, dreidimensionale Trägergerüst perfundiert und wieder zurück in das Gefäß befördert. Die Konvektion des Mediums im Fermenter wird mittels eines magnetgetriebenen, zylindrischen Rührkörpers, der auf der Oberseite mit einem dreiblättrigen Propellerrührer versehen ist, über ein unter dem Gefäßboden befindliches Magnetrührwerk (Variomag, Biomodul, Biosystem B, H&P, Oberschleißheim, Deutschland) realisiert. Eine Gasmischstation mit jeweils vier Massflowmetern übernimmt die Aufgabe der kontrollierten Begasung des Systems über die Mischung der Gase Stickstoff, Kohlendioxid, Sauerstoff und Luft. Über eine Sauerstoffelektrode (mic-biotec, Nörten-Hardenberg, Deutschland) erfolgt die Einstellung des Sauerstoffpartialdrucks entweder manuell oder geregelt. Die Temperatur wird on-line über einen Temperaturfühler gemessen und mit Hilfe eines Thermostaten (Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland) über den Doppelmantel des Fermenters auf konstante 37,0°C eingestellt.

Über die Software mfs und RS232-Schnittstellen gesteuert, gehören zu jedem Bioreaktor drei peristaltische Pumpen (HP-10/90, Meredos). Neben der bereits erwähnten Zirkulationspumpe gehört hierzu eine Pumpe (Abb. 2.11, 1), die die Kultur kontinuierlich mit frischem Medium versorgt. Gleichzeitig wird das verbrauchte Medium über eine Erntepumpe (Abb. 2.11, 2) abgepumpt, wenn die Füllstandsonde (AF, anti-Schaum / Level-Sensor, Meredos) ein Signal erhält. Die Menge des so entfernten Mediums wird mit Hilfe einer Waage (Precisa 6200, Dietikon, Schweiz) on-line kontrolliert.

2. Material und Methoden

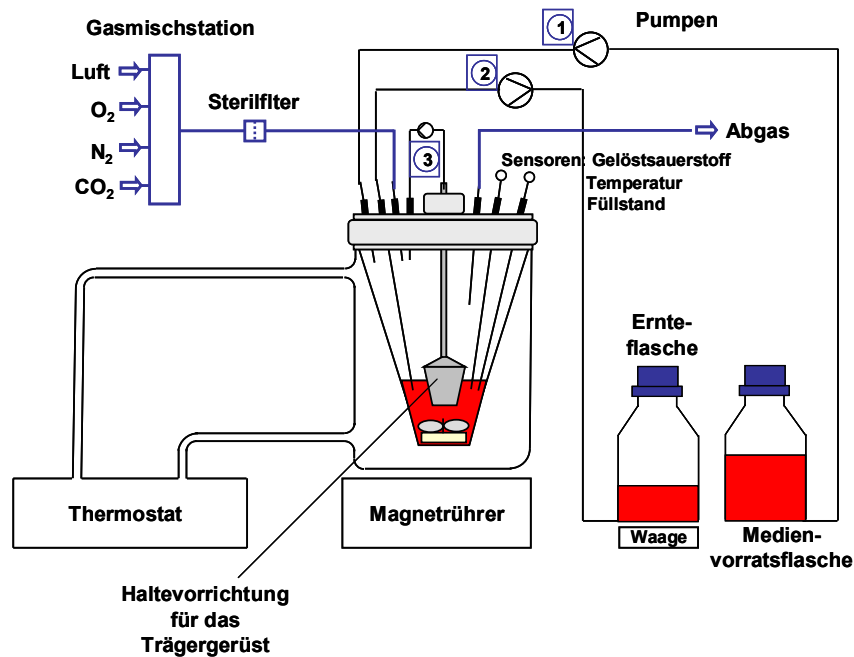


Abb. 2.11: Schematischer Aufbau des kontinuierlichen Perfusionsbiorektorsystems.

2.6.3.2. Kulturführung im Bioreaktor

Zur Sterilisation wurden alle drei Reaktoren mit Vorrats- und Ernte flasche 30 Minuten autoklaviert. Danach wurde jeder Reaktor unter der Sterilbank mit Medium befüllt. Nach der Kalibrierung der Sauerstoffelektrode, wurde das Trägergerüst mit einer Dichte von 10^7 Zellen pro cm^3 besiedelt und in den Reaktor überführt. Anschließend wurde die Kultur im Perfusionsbetrieb gestartet. Alle Experimente wurden mit den folgenden Kultivierungsparametern durchgeführt: 30 mL Arbeitsvolumen, 120 UPM Rührerdrehzahl, 37°C Temperatur, pO_2 : 20% Luftsättigung, $200 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ Perfusionsrate.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Zellisolierung, -proliferation und osteogene Differenzierung

3.1.1. Gewinnung von primären Kaninchenzellen

Zunächst musste ein effizientes reproduzierbares Verfahren entwickelt werden, mesenchymale Kaninchenzellen mit osteogenem Potential in hoher Ausbeute zu gewinnen. In Rahmen des EU-Projekts „*Tissue Reactor*“ konnte die Proliferation primärer Rattenzellen unter dem Einfluss von osteogenen Faktoren (0.2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, 10 nM Dexamethason) erfolgreich entwickelt werden [Barthold, 2003]. Diese Ergebnisse führten zu der Frage, ob sie auch auf die Proliferation osteogener Kaninchenzellen übertragbar waren. Daher wurde insbesondere der Einfluss osteogener Supplemente (s.o.) auf die Bildung der „*Colony-forming-units fibroblasts*“ (CFU-F) bzw. auf die Ausbeute an primären Kaninchenzellen untersucht.

Die entsprechend Kapitel 2.2.2.1. hergestellten und gepoolten Zellisolate wurden in zwei verschiedenen Kulturansätzen ZKT-I, 1% Pen/Strep, 10% FBS, mit und ohne osteogenen Supplementen (OS) weiterkultiviert. Nach drei Tagen Kultivierung wurde das Medium gewechselt, wobei bereits in beiden Kulturansätzen die ersten Kolonien unter dem Mikroskop zu erkennen waren. Sechs Tage nach der Isolierung wurde die Anzahl der Kolonien in den besiedelten Zellkulturflaschen unter dem Mikroskop gezählt. Zur Bestimmung der Zellausbeute wurden die abtrypsinisierten Zellen zusätzlich in einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

Die in der Abbildung 3.12 dargestellte Anzahl der Gesamtkolonien wies zwischen den beiden Kulturansätzen einen großen Unterschied auf. Der Zusatz aller drei osteogenen Supplemente in Kombination erhöhte die Gesamtkoloniedichte gegenüber den Kolonien ohne osteogenen Supplemente um den Faktor 2,38. Zu diesem Zeitpunkt konnte dabei für Kulturmedium mit osteogenen Supplementen eine durchschnittliche Gesamtzellzahl von 20 Millionen Zellen bestimmt werden, während die Zellzahlen des Kulturansatzes ohne osteogene Supplemente mit 10,5 Millionen Zellen deutlich niedriger blieben.

3. Ergebnisse und Diskussion

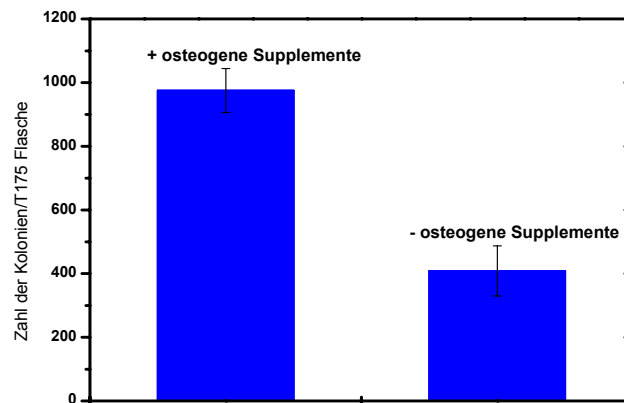


Abb. 3.12: Bestimmung der Kolonienzahl primärer Kaninchenzellen. Kolonien waren bereits sechs Tage nach Isolierung in beiden Ansätzen mit und ohne osteogene Supplemente unter dem Lichtmikroskop zählbar. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils zwei Parallelkulturen in T175-Kulturflaschen.

Die charakteristische CFU-F Bildung konnte bereits sechs Tage nach Isolierung durch einen Vitalitätstest unter dem Mikroskop untersucht werden. Wie in Abb. 3.13 deutlich zu erkennen, zeigten die in Medium mit osteogenen Supplementen kultivierten Zellen dichte, fibroblastoide Phänotypen während Zellen in Kulturmedium ohne osteogenen Supplementen eine flächigere flachere und breitere Morphologie zeigten. Die in Abb. 3.13 gezeigte Morphologie ist repräsentativ für alle durchgeführten Isolierungen.

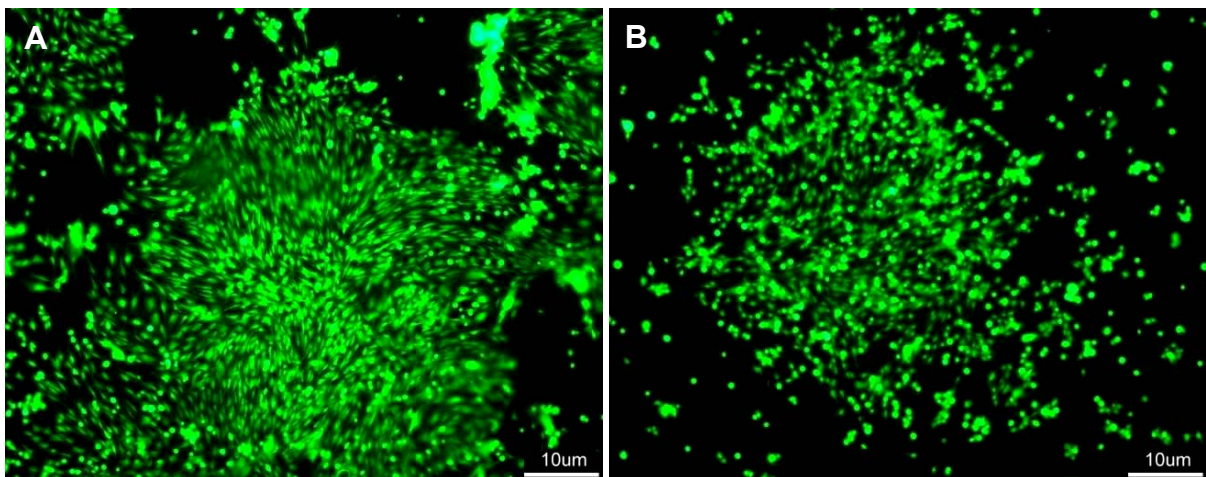


Abb. 3.13: Morphologie der Koloniebildung sechs Tage nach der Isolierung. **A:** Kolonien in ZKT-I Medium mit 1% Pen/Strep, 10% FBS und OS. **B:** Kolonien im gleichen Medium ohne OS. Vitale Zellen wurden mittels Viabilitäts-/Cytotoxizitätstest (s. Kap. 2.5.7) unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert. Phänotypisch zeigten die Kolonien in Kulturmedium mit OS eine dichte fibroblastoide Form. In Kulturmedium ohne OS sind dagegen mehr flache Zellen zu beobachten. Neben mesenchymalen Zellen des Knochenmarks enthalten die Kulturen einen großen Anteil an Verunreinigungen in Form runder Zellen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den durchgeführten Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Zellteilung primärer Kaninchenzellen tatsächlich durch die supplementierten osteogenen Faktoren (0.2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, 10 nM Dexamethason) unterstützt wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Kombination von L-Ascorbat-2-Phosphat, β -Glycerophosphat und Dexamethason die Expression osteoblastärer Phänotypen begünstigt [Aronow et al., 1990], wobei alle drei Faktoren einen unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation und die Differenzierung haben. Das Glucocortikoid Dexamethason stimuliert in der Frühphase die Proliferation und die Differenzierung von Vorläuferzellen [Aubin, 1998]. Dazu wurde von Bellows et al. festgestellt, dass eine Supplementierung von Dexamethason die Proliferation von Rattenzellen der Calvaria erhöht [Bellows et al., 1987]. Demgegenüber hat L-Ascorbat nur einen geringen Einfluss auf die Proliferation, ist aber für die Synthese des Kollagens der extrazellulären Matrix notwendig [Peter et al., 1998, Otsuka et al., 1999]. β -Glycerophosphat hingegen induziert die Mineralisierung der extrazellulären Matrix [Bellows et al., 1992]. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wäre die hier beobachtete Stimulation der Proliferation osteogener Kaninchen hauptsächlich auf die Wirkung von Dexamethason zurückzuführen. Diese Daten sind vergleichbar mit den Ergebnissen von Peter et al., die mit Rattenzellen aus dem Knochenmark gewonnen wurden und deutlich machten, dass durch den Zusatz von osteogenen Supplementen die Proliferation der Zellen nicht inhibiert wurde [Peter et al., 1998]. Auch Coelho und Fernandes zeigten in ihrer Studie, dass der Zusatz aller drei Faktoren in Kombination die Proliferationsrate von humanen Zellen deutlich erhöht [Coelho und Fernandes, 2000].

3.1.2. Subkultivierung osteogener Kaninchenzellen

Für die Herstellung eines hochvitalen Knochenimplantats *in vitro* bedarf es einer ausreichenden Menge an osteogenen Zellen um die Trägergerüste in adäquater Weise besiedeln zu können. Deswegen war die Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung, die Vermehrung von Osteoprogenitorzellen *in vitro* über einen bestimmten Zeitraum im möglichst undifferenzierten Zustand zu verwirklichen. Die Fragestellungen lauteten: Inwieweit ist die Isolierungsmethode reproduzierbar? Wie stark sind die Abweichungen bei der Ausbeute an Primärzellen zwischen

3. Ergebnisse und Diskussion

unterschiedlichen, unter gleichen Bedingungen durchgeführten Isolierungen? Ist das Proliferationsverhalten der Zellen von der Anzahl an Passagen abhängig?

Hierzu wurden Zellen aus dem Knochenmark (Femur/Tibia) von 4 Kaninchen isoliert, wobei acht separate Isolierungen miteinander verglichen wurden. Unter Zusatz des Kulturmediums (ZKT-I, 10% FBS, 1% Pen/Strep, 0.2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, 10 nM Dexamethason) wurden die Knochenmarkzellen in jeweils zwei T175 Kulturflaschen pro Isolierung kultiviert. Drei Tage nach der Isolierung lassen sich die adhärennten mesenchymalen Zellen des Knochenmarks von den nicht-adhärennten hämatopoetischen Zellen trennen, in dem in allen Flaschen das Medium gewechselt wurde. Im Anschluss an eine sechstägige Proliferationsphase, wurden die Kolonien unter dem Mikroskop gezählt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst, resuspendiert und erneut ausgesät. Somit konnte die Subkultivierung der osteogenen Zellen über fünf Passagen unter gleichen Kulturbedingungen beobachtet und analysiert werden. Die ausplattierte Dichte bei der Subkultivierung osteogener Kaninchenzellen lag bei $1,0 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 . Höhere Animpfdichten führten bereits bei den Vorversuchen zu einer Inhibierung des Zellwachstums. Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz nach jeweils demselben Prinzip passagiert. Zur Ermittlung eines Messwertes wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

In Tabelle 3.1 ist die Zahl der gewonnenen Kolonien aus den insgesamt acht Isolierungen dargestellt.

Tab. 3.1: Vergleich der Kolonienanzahl von acht Isolierungen aus Kaninchenknochenmark. T175-F1/F2: Kulturflasche.

Isolierung Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
T175/F1	926	1009	1030	957	1032	1030	989	926
T175/F2	1023	998	1045	956	1028	1029	897	920
Durchschnittliche Kolonienzahl	974.5	1003.5	1037.5	956.5	1030	1029.5	943	923

Die gewonnene Kolonienzahl (Tabelle 3.1) verlief in allen acht Isolierungen recht ähnlich. In allen Kulturflaschen waren CFU-F zu erkennen. Der durchschnittliche Mittelwert lag bei 987 ± 44 Kolonien pro T175-Kulturflasche mit einer im Vergleich zur

3. Ergebnisse und Diskussion

Arbeit von Anselme et al. deutlich kleineren Abweichung [Anselme et al., 1999]. Anselme et al., fanden zwischen unterschiedlichen Tieren extrem große Streuungen von über 100% bei der Ausbildung von CFU-F aus primären Kaninchenzellen.

Die im vorliegenden Experiment gewonnenen Kolonien hatten allerdings unterschiedliche Durchmesser; manche waren kleiner mit vielen Zellen, anderen waren zwar groß, enthielten aber vergleichsweise weniger Zellen, weswegen als zusätzlicher Vergleichparameter die Zellausbeute jeder Isolierung herangezogen wurde. Die Zellzahlen wurden jeweils aus Doppelbestimmungen ermittelt.

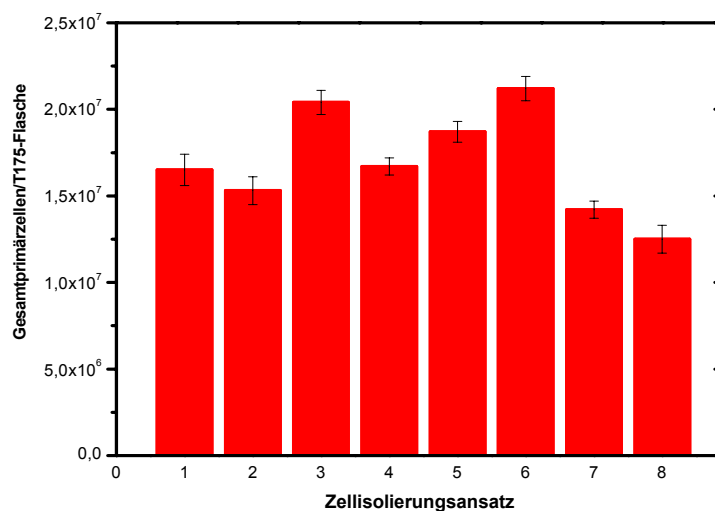


Abb. 3.14: Ausbeute an adhärenenten, koloniebildenden Primärzellen aus acht parallel durchgeführten Isolierungen. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer nach Trypanblaufärbung ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils zwei T175-Kulturflaschen.

Abb. 3.14 zeigte die Ausbeute an Primärzellen aus Kaninchenknochenmark von acht parallel durchgeführten Isolierungen. Alle Isolierungen zeigten ähnliche Zellausbeuten, die Isolierungen 7 und 8 ergaben bereits niedrige Werte aufgrund der relativ späten Durchführung der Knochenmarksisolierung. Zeit spielte eine große Rolle bei der Isolierung; je schneller das Knochenmark isoliert wurde, desto besser war auch die Ausbeute. Im Verlauf dieser Arbeit wurden insgesamt 10 weitere Isolierungen mit jeweils zwei Kaninchen durchgeführt, wobei eine missglückte und keine Primärzellen isoliert werden konnten, da das Knochenmark aus Femur und Tibia erst nach 1,5 Stunden isoliert wurde. Die mittlere Abweichung der Zellausbeute zwischen den 8 Isolierungen dieses Experiments lag bei 30%.

Die Gesamtzahl der isolierten Knochenmarkzellen, also inkl. aller hämatopoetischen Zellen lag zwischen 10^8 und 10^9 Zellen. Daraus wurde die Plattierungseffizienz

3. Ergebnisse und Diskussion

berechnet, die ein Maß der resultierenden Kolonien bezogen auf die Zellzahl nach der Isolierung der Zellen aus dem Knochenmark ist:

$$\text{Plattierungseffizienz} = \text{Zahl der Kolonien} / \text{Gesamtzellzahl}$$

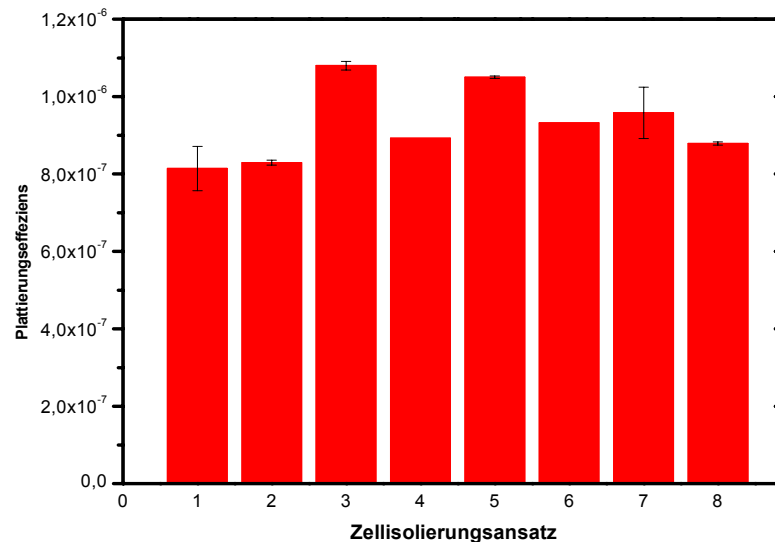


Abb. 3.15: Vergleich der Plattierungseffizienz aus acht parallel durchgeführten Isolierungen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils zwei T175-Kulturflaschen.

Die aus der Plattierungseffizienz (Abb. 3.15) berechnete Konzentration der CFU-Fs in allen acht Isolierungen liegt im Mittel bei ca. einer Zelle pro $1,1 \cdot 10^6$ Zellen. Theoretisch liegt die Konzentration von mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark bei etwa einer pro 10^5 Zellen [Prockop, 1997]. Die großen Abweichungen sind im Zusammenhang mit der Kulturdurchführung zu betrachten, wobei bei der durchgeführten Methode ein großer Anteil an Verunreinigungen (z.B. Erythrocyten) vorhanden war, was die Gesamtzellzahl nach der Isolierung erhöhte. Mit Hilfe von Medienwechseln und durch mehrfaches Passagieren lassen sich jedoch die nicht-adhärenenten Zellen sukzessive entfernen. In Vorversuchen wurde auch ein Percoll-Gradient benutzt, wodurch die Erythrocyten von mesenchymalen Stammzellen abgetrennt werden konnten. Allerdings wurde die Zellausbeute dadurch so verringert (Daten nicht gezeigt), dass im Weiteren auf diese Technik verzichtet wurde. Die Aufreinigung der Kultur wurde stattdessen durch mehrfaches Passagieren erreicht. Hierzu wurden die Progenitorzellen über fünf Passagen kultiviert.

3. Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 3.16 ist die Gesamtzellausbeute in Abhängigkeit von der Passagenzahl unterschiedlicher Isolierungen dargestellt. Nach der fünften Passage ergaben sich dabei Ausbeuten an Zellmaterial zwischen $1,13 \cdot 10^9$ - $2,2 \cdot 10^9$ Zellen. Diese Zellmenge reichte aus um Experimentreihen im Bioreaktor durchzuführen. Die Isolierungen 1, 2 und 3 brachten eine um 50% geringere Gesamtzellausbeute im Vergleich zu den Isolierungen 4, 5, 6, 7 und 8 obwohl die Kulturführung unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurde. Bedingt durch die Tatsache, dass die Isolierung des Knochenmarks aus 4 verschiedenen Kaninchen erfolgte und den sich über fünf Passagen potenzierenden Abweichungen der Proliferation inhomogener Zellpopulationen, ist diese Streuung dennoch als akzeptabel anzusehen.

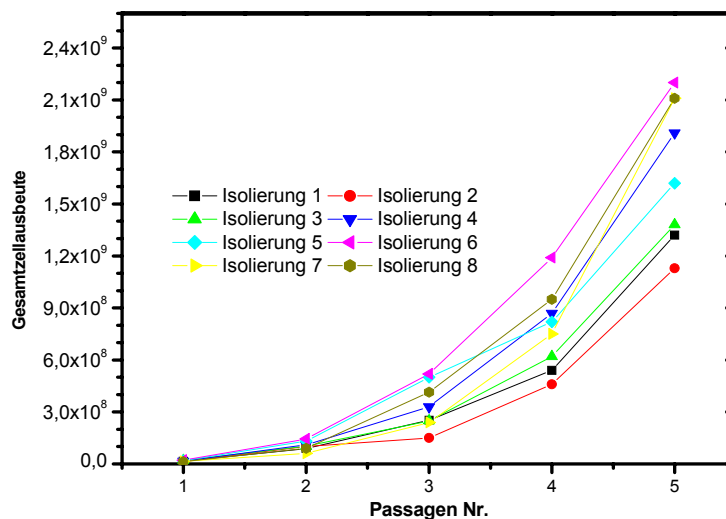


Abb. 3.16: Entwicklung der Gesamtzellausbeute von Osteoprogenitorzellen in Abhängigkeit von der Passagenzahl.

Um das Wachstum der Zellen noch weiter zu charakterisieren wurde anschließend auch die Verdopplungszeit der Knochenvorläuferzellen berechnet (Abb. 3.17). Es konnte gezeigt werden, dass die Verdopplungszeiten mit zunehmender Passagenzahl anstiegen. Zellen der zweiten Passage wuchsen mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von etwa 21,5 Stunden am schnellsten. Dagegen benötigten Zellen der fünften Passage durchschnittlich 137 Stunden um sich zu teilen. Es ist daher anzunehmen, dass mit zunehmender Passagenzahl eine geringere Anzahl proliferationsfähiger Vorläuferzellen vorhanden war, während die restlichen Zellen bereits in die Differenzierungsphase eingetreten waren. Zellen der vierten Passage wurden schließlich als am besten für weiterführende Experimente geeignet ausgewählt, da sich mit $4,6 \cdot 10^8$ - $1,19 \cdot 10^9$ Zellen ausreichend hohe

3. Ergebnisse und Diskussion

Zellzahlen mit einer akzeptablen Verdopplungszeit kombinieren ließen. Bei einer zusätzlichen fünften Passage (137 Stunden Verdopplungszeit) hätte sich die Kultivierungszeit hingegen schon unverhältnismäßig verlängert.

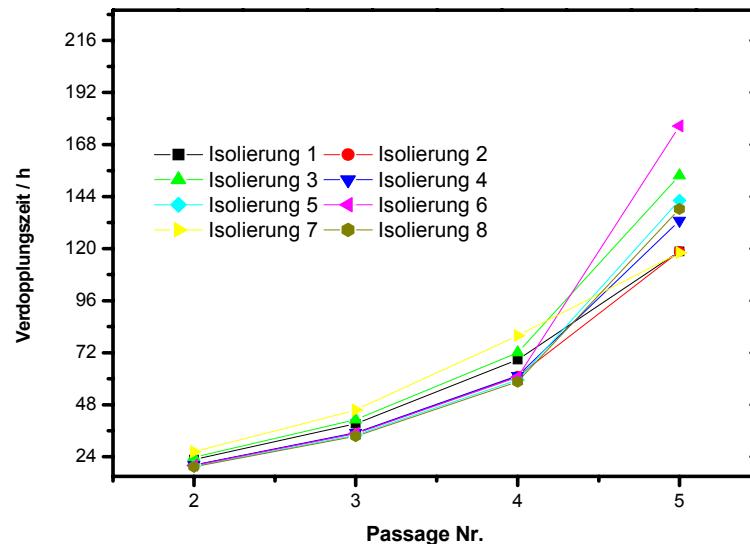


Abb. 3.17: Abhängigkeit der Verdopplungszeit von der Passagenzahl.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bezüglich der Zellausbeute keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von unterschiedlichen, unter gleichen Bedingungen durchgeführten Isolierungen ermittelt werden konnten. Durch die anschließende Subkultivierung wurde eine Zellzahl von $4,6 \cdot 10^8$ - $1,19 \cdot 10^9$ Zellen in der vierten Passage erzielt. Diese Menge reicht aus, um mehrere Trägergerüste parallel unter optimalen Bedingungen besiedeln zu können. Die ausplattierte Dichte bei der Subkultivierung osteogener Kaninchenzellen lag bei $1,0 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 . Höhere Animpfdichten führten bereits bei den Vorversuchen zu einer Inhibierung des Zellwachstums. Die mittlere Verdopplungszeit osteogener Kaninchenzellen der vierten Passage lag bei ca. 65 Stunden. Diese Erkenntnisse sind vergleichbar mit denen in den *in vitro* Studien von Bruder et al., welche Verdopplungszeiten von 60-70 Stunden bei humanen osteogenen Zellen erreichten [Bruder et al., 1997]. Die von Barthold ermittelten Verdopplungszeiten von Rattenzellen liegen mit 45-50 Stunden unter diesen Werten [Barthold, 2003]. Die Gründe für diese Schwankungen im Verhalten der osteogenen Zellen können auf die verschiedenen Isolierungsmethoden sowie die unterschiedlichen Spezies zurückzuführen sein.

Zusätzlich zur Zellproliferation musste auch das osteogene Potential der Zellen getestet werden. Aus diesem Grund wurden wie im nächsten Abschnitt beschrieben

3. Ergebnisse und Diskussion

die osteogenen Zellen des Kaninchens der vierten Passage eingehender charakterisiert.

3.1.3. Charakterisierung der Kaninchenknochen-Vorläuferzellen

Eine umfangreiche Charakterisierung der verwendeten Kaninchenosteoprogenitoren hinsichtlich Proliferation, Differenzierung und Mineralisierung diente als Basis für alle weiterführenden Experimente. Hierzu wurden die Zellen in 48-Well-Platten mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro cm^2 ausgesät. Als Medium wurde serumhaltiges Zellkulturmedium mit osteogenen Supplementen und Antibiotika verwendet: ZKT-I, 10% FBS, 1% Pen/Strep, 0,2 nM L-Ascorbat-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat und 10 nM Dexamethason. Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Serum auf 1% reduziert um weiteres Wachstum zu minimieren und eine Differenzierung zu ermöglichen. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde mit Hilfe des Vitalitätstests WST-1 und der Entwicklung der Proteinkonzentration beobachtet (Abb. 3.20). Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe der Micro-BCA Methode nach dem Lysieren der Zellen durchgeführt. Die Bestimmung der Alkalische Phosphatase-Aktivität wurde proteinspezifisch angegeben.

Wie in Abb. 3.18A ersichtlich ist, haben die undifferenzierten Vorläuferzellen eine spindelförmige Morphologie. Mit zunehmender Kulturdauer bildeten die Zellen einen konfluenten Monolayer (Abb. 3.18B).

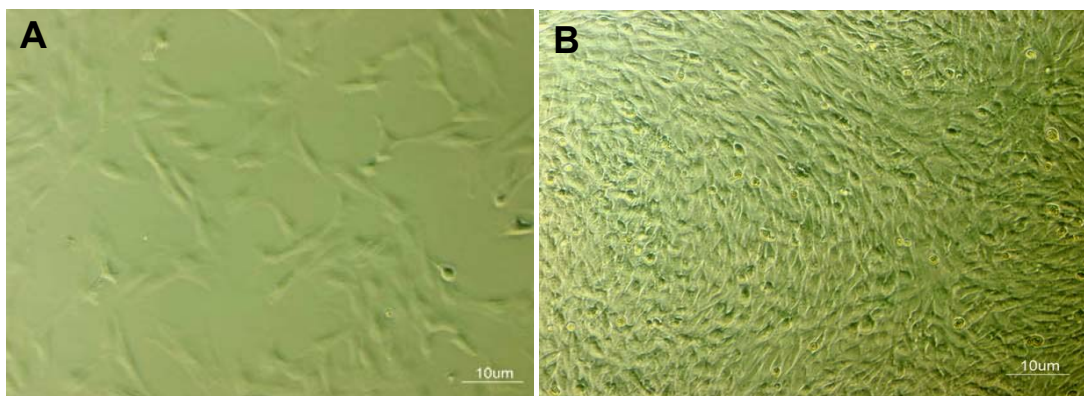


Abb. 3.18: Lichtmikroskopische Aufnahmen osteogener Kaninchenzellen. (A): 48 Stunden nach Aussat zeigten die Zellen einen spindelförmigen Phänotyp. (B): Konfluente Kultur nach 7 Tagen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Wie zu sehen ist, war die Kultur homogen und ließ keine Verunreinigung mit Erythrocyten erkennen. Während der Proliferationsphase wurde unter den Kulturbedingungen auch eine kollagenhaltige extrazelluläre Matrix produziert. Diese konnte histologisch mittels Direktrot Färbung sichtbar gemacht werden (Abb. 3.19).

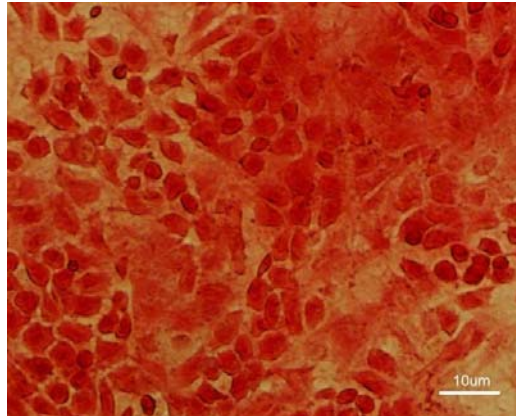


Abb. 3.19: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Direktrot-Färbung auf Kollagen in einer über 7 Tage geführten Kultur osteogener Kaninchenzellen.

Die Analyse der metabolischen Aktivität (Abb. 3.20A) der Zellen zeigte nach einer Kultivierungszeit von vier Tagen ein Maximum. Sieben Tage nach dem Erreichen der Konfluenz nahm der WST-1 Umsatz der Zellen stark ab, während das Gesamtprotein die ganze Zeit weiter zunahm (Abb. 3.20B).

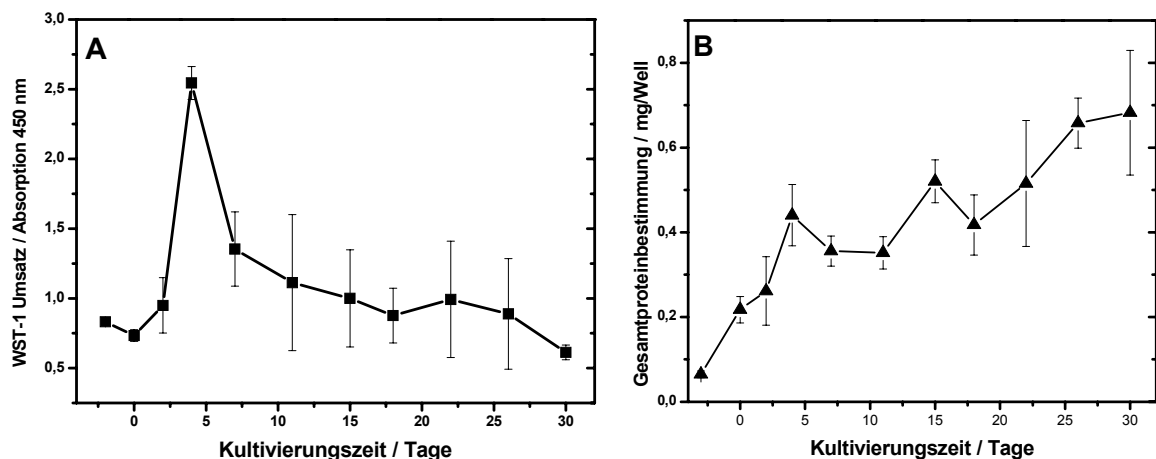


Abb. 3.20: (A): Zeitlicher Verlauf der in *in vitro* Kultur erreichten metabolischen Aktivität, bestimmt mit Hilfe des WST-1-Tests. (B): Zeitliche Entwicklung des mittels Micro BCA-Methode ermittelten Gesamtproteininhalts osteogener Kaninchenzellen. Tag 0 ist der Tag des Erreichens der Konfluenz. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Parallelkulturen in 48-Well-Platten.

3. Ergebnisse und Diskussion

Der Rückgang der metabolischen Aktivität der Zellpopulation könnte einerseits auf die mit der Reduzierung des Serums einhergehende beschleunigte Matrixmineralisierung und Apoptose von Zellen zurückzuführen sein [Manolagas, 2000] und andererseits an der WST-1-Methode selbst liegen. Die Reduzierung der Tetrazoliumsalzes zu Formazan ist nur dann direkt proportional zur Zellzahl wenn diese sich ähnlich einer Zelllinie metabolisch identisch verhalten. Dies ist jedoch bei einer differenzierenden Zellpopulation nicht der Fall. Studien von Komarova et al. haben das Zellmetabolismus bei der Kultivierung von Rattenkalvarienzellen untersucht [Komarova et al., 2000]. Dabei wurde nachgewiesen, dass sich die mitochondriale Aktivität der Zellen in der Differenzierungsphase stark ändert. Während der Proliferationsphase nimmt die mitochondriale Aktivität zu, während der Differenzierungsphase nimmt sie hingegen ab. Dies erklärt die Reduzierung der metabolischen Aktivität bzw. der Vitalität der Zellen im späteren Verlauf der post-konfluenten Phase.

Mit dem Beginn der Matrixreifung beginnt die Expression der Alkalischen Phosphatase (AP), die als früher Marker der Osteoblastendifferenzierung akzeptiert ist [Rodan et al., 1988]. Sie wird bereits im Präosteoblastenstadium oder noch früher stark exprimiert. Die proteinspezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität der Osteoblasten-Kultur stieg während der Proliferationsphase kontinuierlich an bis sie 12 Tage nach Konfluenz ein Maximum erreichte und danach langsam wieder abnahm. In dieser Phase setzte die Mineralisierung der extrazellulären Matrix ein, was durch die Zunahme der Calciumeinlagerung nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.21).

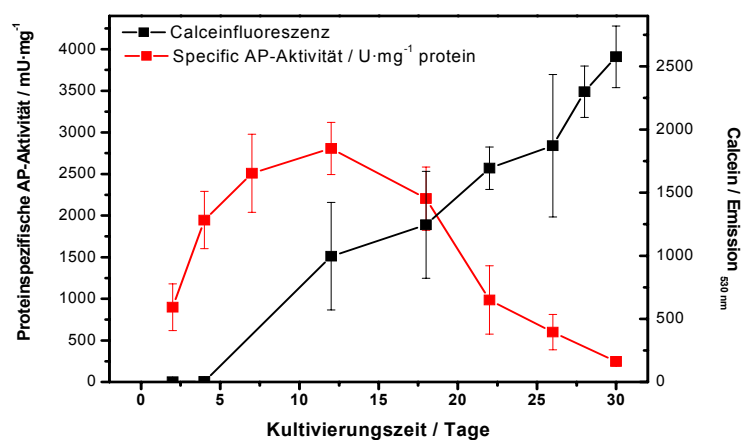


Abb. 3.21: Zeitlicher Verlauf der proteinspezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität und der Matrixmineralisierung. Alkalische Phosphatase ist ein früher Marker der Osteogenese. Nach 12 Tagen, gleichzeitig mit dem Beginn der Matrixeinlagerung extrazellulären Calciums erreicht sie ihre maximale Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Parallelkulturen in 48-Well-Platten.

3. Ergebnisse und Diskussion

Diese Ergebnisse korrelieren gut mit dem von Owen et al. entwickelten Modell der dreiphasigen Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten (Proliferation, Matrixreifung und Mineralisierung) [Owen et al., 1990]. Nach diesem Modell erreicht die AP-Expression ihren Höhepunkt in der Matrixreifung und sinkt danach ab. Zu diesem Zeitpunkt wird die Calciumeinlagerung in die extrazelluläre Matrix in der Mineralisierungsphase gesteigert. Dieses konnte durch die eigenen Ergebnisse bestätigt werden.

Parallel zu den biochemischen Untersuchungen wurden die Kulturen auch histologisch untersucht. In den hier vorgestellten Ergebnissen der AP-Färbung zeigte sich eindeutig, dass die Zellen am Höhepunkt der AP-Aktivität an Tag 12 mit violetter bis schwarzer Färbung auf die AP-Färbung mit NBT/BCIP (Abb. 3.22B) reagierten.

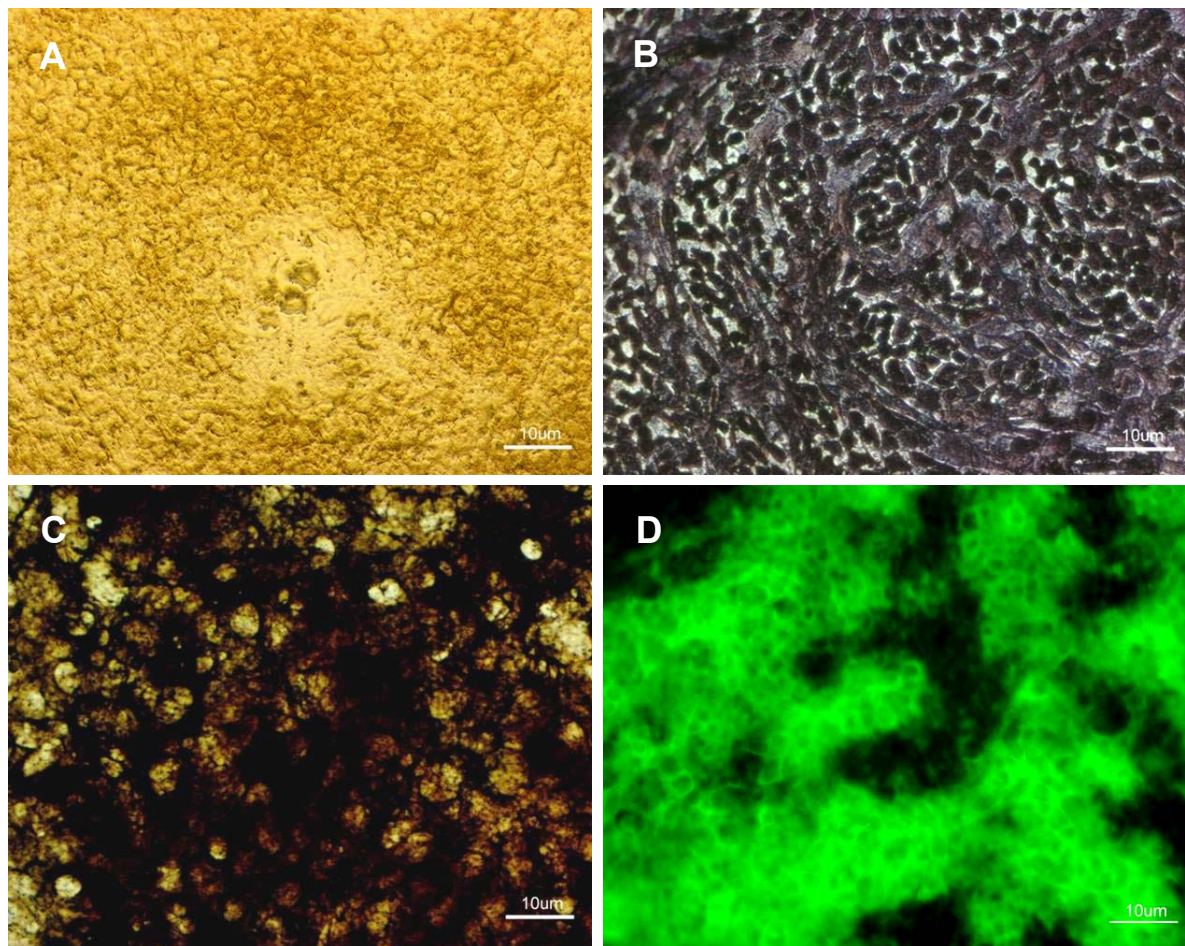


Abb. 3.22: Lichtmikroskopische Aufnahme von Färbungen osteogener Kaninchenzellen. **(A):** Kontrolle (12 Tage nach Konfluenz, wobei die dunkleren Stellen auf einsetzende Mineralisierung hinweisen, wie mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden kann). **(B):** Starke Alkalische Phosphatase Färbung am Tag 12 (violette bis schwarze Färbung mit NBT/BCIP). **(C):** Von Kossa-Färbung auf Mineralisierungszonen (braune bis schwarze Färbung) am Tag 28. **(D):** „Nodules“ lassen sich auch durch Umsetzung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein sichtbar machen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Mineralisierung der Matrix wurde an den Tagen 2, 4, 6, 18, 22 und 28 mittels von Kossa-Färbung nachgewiesen, wobei die Variation der Farbintensität als Ausdruck eines unterschiedlichen Mineralisierungsgrades der extrazellulären Matrix betrachtet werden kann (Abb. 3.23). Am Tag 28 ist die stärkste Mineralisierung zu erkennen (Abb. 3.23C). Dies stimmt auch mit den Ergebnissen der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein überein, der sich an das extrazelluläre Calcium bindet (Abb. 3.23D). Bei diesen histologischen Untersuchungen bestätigte sich noch einmal das festgestellte Entwicklungsprofil der Knochenvorläuferzellen während der Differenzierung und der Mineralisierung.

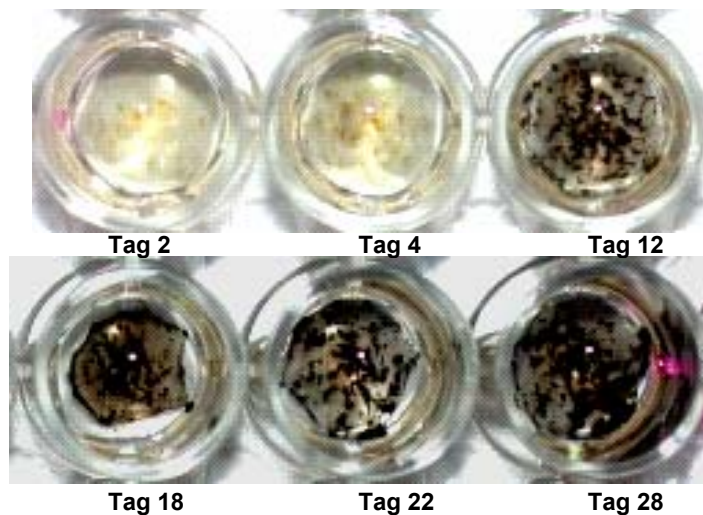


Abb. 3.23: Entwicklungsprozess der Mineralisierung einer Osteoblasten-kultur. Die kultivierten Zellen wurden an den Tagen 2, 4, 12, 18, 22 und 28 fixiert und einer Von Kossa-Färbung unterzogen. Eine signifikante Einlagerung von Calcium (schwarze Farbe) wurde 12 Tage nach Erreichen der Konfluenz festgestellt, was mit der Bestimmung des extrazellulären Calciums über Calcein korrelierbar war.

Zusammenfassend lieferten die biochemischen und histologischen Auswertungen vergleichbare Ergebnisse. Die isolierten Kaninchenzellen der vierten Passage konnten erfolgreich zur Differenzierung in die osteogene Linie angeregt werden. Die gewonnenen Daten korrelieren gut mit dem von Owen et al. entwickelten Modell der dreiphasigen Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten [Owen et al., 1990] (Abb. 3.24).

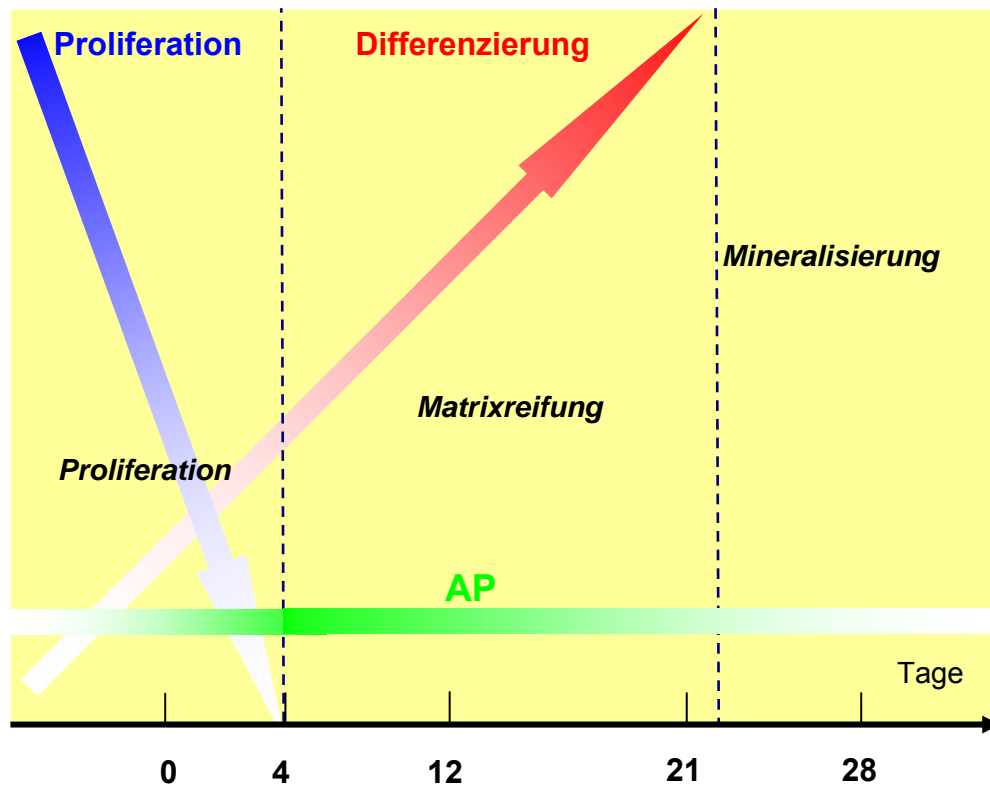


Abb. 3.24 Schematische Darstellung der drei Entwicklungsphasen von Kaninchen-Osteoblasten: Proliferation, Matrixreifung und Mineralisierung. Das Schema entspricht dem von Owen et al. entwickelten Modell und ist aus den biochemischen Daten der Abb. 3.20 und 3.21 sowie den histologischen Färbungen (Abb. 3.22; 3.23) experimentell abgeleitet. Tag 0 wurde als Tag der Konfluenz definiert.

3.2. Entwicklung eines für die Kultivierung osteogener Kaninchenzellen geeigneten serumreduzierten Mediums

3.2.1. Induktion der Adipogenese unter Zusatz von Kaninchenserum

Als xenogenes Serum kann fötales Kälberserum sowohl eine mögliche Infektion mit Rinder-spezifischen Erregern, als auch eine immunologische Reaktion bei der Implantation im Tierversuch verursachen, weshalb autologes Serum prinzipiell besser für klinische Anwendungen geeignet ist. Für die geplanten Tierexperimente im Kaninchendefektmodell war eine Gewinnung autologen Serums jedoch nicht durchführbar und es musste stattdessen auf allogenes Serum zurückgegriffen werden. Zur Untersuchung des Einflusses von allogenen Kaninchenserum (KS) auf die Proliferation von Zellen der vierten Passage wurde das folgende Experiment durchgeführt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Zellen wurden in 48-Well-Platten in einer Dichte von 5000 Zellen pro cm^2 in Medium (ZKT-I, 0.2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat und 10 nM Dexamethason, 1% Pen/Strep) unter Zugabe unterschiedlicher Serumkonzentrationen (0 / 1 / 5 / 7 / 10 / 15 / 20% KS) ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 12,5% CO_2 sieben Tage inkubiert. Als Kontrolle wurden weitere Kulturen in ZKT-I mit entsprechenden FBS-Konzentrationen mitgeführt. Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt. Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe der WST-1-Methode bestimmt, wobei die Ergebnisse in Abb. (3.25) zusammengefasst sind.

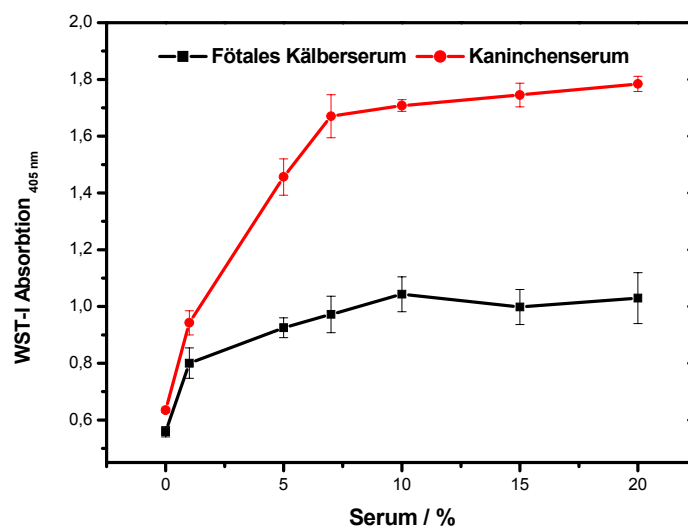


Abb. 3.25: Einfluss der Serumkonzentration auf die Proliferation von Kaninchenzellen, untersucht mit Hilfe des WST-1-Tests. Kulturen in Medium mit Kaninchenserum zeigten eine stärkere Proliferation als in den Vergleichskulturen mit fötalem Kälberserum. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Parallelkulturen in 48-Well-Platten.

Wie in Abbildung 3.25 ersichtlich, ist die metabolische Aktivität der in Medium mit Kaninchenserum kultivierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollkulturen mit fötalem Kälberserum deutlich erhöht. Betrachtet man beide Kurven, so erreichten die Zellen in beiden Kulturen bei 10% Serumkonzentration das Maximum. Eine weitere Erhöhung des Serumanteils auf über 20% führte in keinem der beiden Ansätze zu einer weiteren Steigerung der Vitalität der Zellen.

Generell hat Kaninchenserum einen beschleunigenden Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Diese Beschleunigung scheint aber trotz Zugabe osteogener Supplemente vornehmlich mit einer vermehrten Differenzierung zu Fettzellen assoziiert zu sein. Hieraus ergab sich die Frage ab welcher KS-Konzentration die

3. Ergebnisse und Diskussion

Zellen zu Adipocyten differenzieren. Zur Überprüfung wurde ein weiteres Experiment, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, durchgeführt.

Kaninchenzellen der vierten Passage wurden in 48-Well-Platten in einer Dichte von 5000 Zellen pro cm^2 ausplattiert. Die Zellen wurden in gleichen Medium (s.o.) mit unterschiedlichen KS-Konzentrationen kultiviert. Nach 7 Tagen wurde die Vitalität der Zellen mittels WST-1-Reagenz bestimmt (Abb. 3.26A). Nach Fixierung der Kulturen mit 4% PFA und anschließender Sudan-III-Färbung wurde die Adipocytenanzahl unter dem Mikroskop bestimmt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt (Abb. 3.26, B).

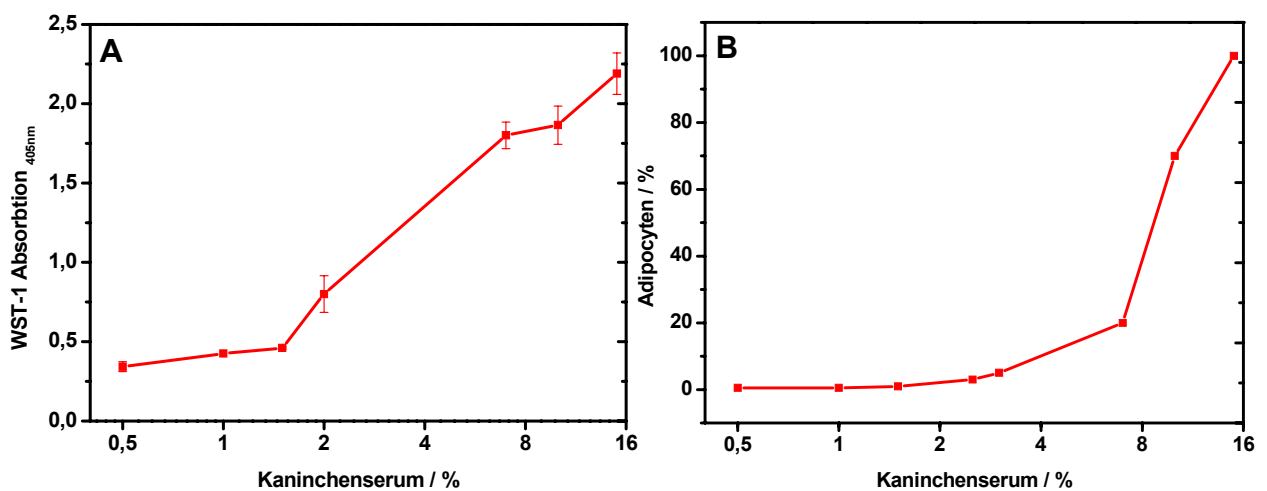


Abb. 3.26: Einfluss von Kaninchenserum auf die Proliferation von Kaninchenzellen, untersucht mit Hilfe des WST-1-Tests nach siebentägiger Kultivierung (A) und der Quantifizierung des relativen Adipocytenanteils (B).

Wie in Abb. 3.26 dargestellt, ist insgesamt ein Anstieg der Vitalität der Zellen sowie des Adipocytenanteils mit zunehmender KS-Konzentration festzustellen. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der zunehmenden Adipocytenanzahl in Abhängigkeit von der KS-Konzentration sind auch in Abbildung 3.27 durch mikroskopische Aufnahmen verdeutlicht.

3. Ergebnisse und Diskussion

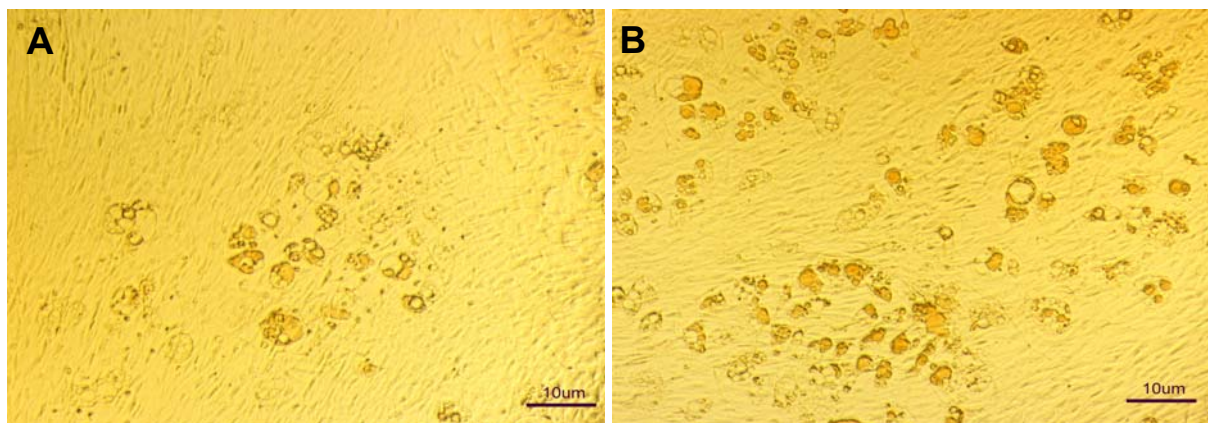


Abb. 3.27: Nachweis von Fettzellen in Medien mit unterschiedlichem Kaninchenserumanteil (3%, **A**; 15%, **B**) durch Sudan-III-Färbung.

Auch mittels Alkalische Phosphatase-Färbung durch das NBT/BCIP-Reagenz (Abb. 3.28) konnten im Vergleich zu in Medium mit 10% FBS kultivierten Zellen in Kulturen mit KS nur wenige Osteoblasten (Abb. 3.28, A) identifiziert werden. Stattdessen wurde eine hohe Anzahl von Adipocyten festgestellt.

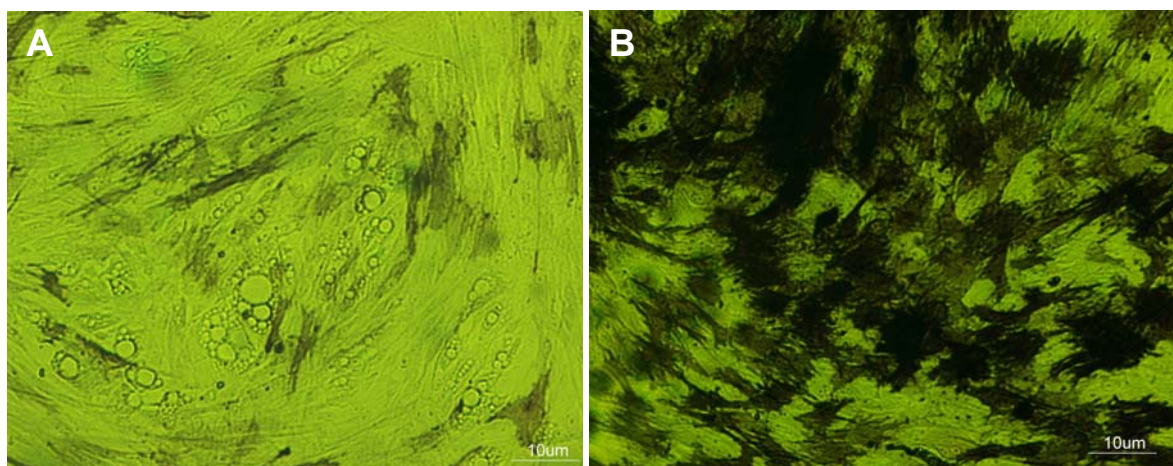


Abb. 3.28: Alkalische Phosphatase-Färbung von KMSZs mittels NBT/BCIP-Reagenz in Anwesenheit von Kaninchenserum (**A**) oder fötalem Kälberserum (**B**) nach siebentägiger Kultivierung. In der Kultur mit KS waren nur sehr wenige AP-positive Zellen vorhanden. Stattdessen wurden die für Adipocyten charakteristischen Fetttröpfchen gefunden.

Zusammenfassend führte der Einsatz von Kaninchenserum bei der Differenzierung von Knochenvorläuferzellen des Kaninchens *in vitro* sowohl zur Ausbildung des Adipocyten- als auch des Osteoblasten-Phänotyps. Ein entsprechender Effekt wurde in mehreren Studien [Diascro et al., 1998; Hart et al., 1994; Nuttall et al., 1994]

3. Ergebnisse und Diskussion

berichtet, wobei er in der vorliegenden Arbeit erstmals hinsichtlich der Differenzierung von Kaninchenosteoprogenitoren untersucht wurde.

Diascro et al. zeigten anhand von *in vitro* Experimenten mit den humanen Osteosarkomzelllinien MG-63- und Saos-2, dass die Differenzierung dieser Zellen zu Adipocyten durch die Fettsäuren, die in KS enthalten sind, induziert wurde [Diascro et al., 1998]. Aus diesem Grund war es bei dieser Arbeit von Interesse, auch ein lipidfreies Kaninchenserum einsetzen zu können.

Hierzu wurde das Kaninchenserum (20 mL) nach dem Auftauen und der Komplementinaktivierung zunächst für eine Stunde bei 60000 Upm in der Ultrazentrifuge (Beckman L5-75) mit dem Rotor TI 70 (Beckman, Fullerton CA, USA) zentrifugiert. Anschließend konnten zwei getrennte Phasen beobachtet werden: das von Lipidpartikeln befreite, reine KS und die milchig-trüben Chylomikronen (Abb. 3.29).

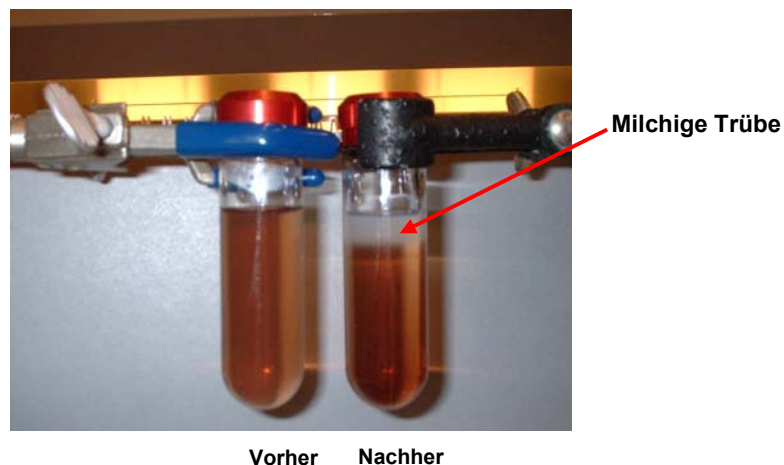


Abb. 3.29: Ultrazentrifugation des Kaninchenserums zur Abtrennung von Chylomikronen.

Die milchig-trübe obere Phase aus 20 mL KS machte 18,5% aus und wurde abgetrennt. Um ihre Wirkung auf die Differenzierung der Zellen zu überprüfen, wurden Kaninchenzellen der vierten Passage in 48-Well-Platten ausplattiert und in den folgenden vier verschiedenen Medien kultiviert:

Medium Nr. 1: 10% Kaninchenserum + 1% Pen/Strep + ZKT-I + OS (osteogene Supplemente) als Positivkontrolle

Medium Nr. 2: 10% (FBS+ die milchig-trübe Chylomikrone-Phase) + Pen/Strep + ZKT-I + OS

Medium Nr. 3: 10% FBS + 1% Pen/Strep + ZKT-I + OS als Negativkontrolle

Medium Nr. 4: 10% des gereinigten KS, ZKT-I, 1% Pen/Strep + OS

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Kultivierung dauerte sieben Tage und das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die Adipocytenanzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2: Ergebnisse der adipogenen Differenzierung von Kaninchenzellen in vier unterschiedlichen Medien. ----- keine Adipocyten; ++++++ sehr viele Adipocyten; + sehr wenige Adipocyten.

Medium	Adipocyten
Medium Nr. 1	+++++
Medium Nr. 2	+
Medium Nr. 3	-----
Medium Nr. 4	+++++

Die Daten zeigen eindeutig, dass trotz der Entfernung der Chylomikronen aus dem Serum eine Differenzierung zu Adipocyten nicht verhindert werden konnte und dass Chylomikronen allein nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Adipogenese führen. Es ist davon auszugehen, dass andere im Kaninchenserum enthaltene lipidartige Substanzen, die sich durch eine einfache Dichtegradientenultrazentrifugation nicht abtrennen lassen und entweder an Albumin oder Lipoproteine (LDL, HDL) gebunden sind, für die beobachtete Adipogenese verantwortlich zeichnen.

Untersuchungen von Oreffo et al. zeigten z.B., dass kultivierte humane Knochenmarkszellen in α MEM mit 10 % Humanserum sowohl zu Osteoblasten als auch zu Adipocyten differenzierten. Humanserum enthält demnach ebenfalls Faktoren mit adipogenem Potential. Sogar die Kultivierung in Gegenwart von Dexamethason (10 nM), das die Differenzierung zu Osteoblasten stimuliert [Aubin, 2000], konnte die Entstehung von Fettzellen nicht verhindern [Oreffo et al., 1997]. Nicht zuletzt deswegen wäre der Einsatz eines serumfreien oder zumindest serumreduzierten Mediums sehr wünschenswert.

3.2.2. Einfluss von Cytokinen auf Kaninchenknochen-Vorläuferzellen

Fast alle Primärzellen werden routinemäßig in Kulturmedium mit fötalem Kälberserum kultiviert. FBS besteht aus mehr als 5000 Einzelsubstanzen, z.B. Hormonen und Wachstumsfaktoren sowie anderen, nicht definierten Komponenten [Minuth et al., 2003]. Für einen klinischen Einsatz besteht allerdings das Risiko einer Kontamination (Mikroorganismen, Viren, Prionen) oder einer immunologischen

3. Ergebnisse und Diskussion

Abstoßungsreaktion nach Implantationen. Durch den Einsatz serumfreier Medien könnte dieses Risiko deutlich reduziert werden. Um ein geeignetes Medium zusammenzustellen bietet sich ein breites Spektrum an Cytokinen an, die die Proliferation von Osteoprogenitoren stimulieren wie z.B. *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2), *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF-BB), *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Insulin-like Growth Factor I* (IGF-I). In Tab. 3.3 sind 15 unterschiedliche Medien (mit jeweils 1% Pen/Strep eingesetzt) aufgelistet, die in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Wirkung auf osteogene Zellen untersucht wurden.

Tab.3.3: Auflistung der verschiedenen Medienansätze. Als Positiv- und Negativkontrolle wurde jeweils der Ansatz Nr.1 und der Ansatz Nr.3 angenommen. Alle Cytokine wurden in einer Konzentration von $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ eingesetzt. ITA: Insulin, Transferrin und Albumin.

Nr. Medium	
1	15% FBS, ZKT-I
2	1% FBS, ZKT-I, ITA, Dex, L-ASc., Beta-Gly
3	1% FBS, ZKT-I, ITA
4	0% FBS, ZKT-I
5	1% FBS, ZKT-I, FGF2, PDGF-BB, ITA
6	1% FBS, ZKT-I, EGF, ITA
7	1% FBS, ZKT-I, IGF, ITA
8	1% FBS, ZKT-I, FGF2, ITA
9	1% FBS, ZKT-I, PDGF-BB, ITA
10	1% FBS, ZKT-I, PDGF-BB, EGF, ITA
11	1% FBS, ZKT-I, PDGF-BB, IGF, ITA
12	1% FBS, ZKT-I, PDGF-BB, EGF, IGF
13	1% FBS, ZKT-I, FGF2, PDGF-BB, EGF, ITA
14	1% FBS, ZKT-I, FGF2, PDGF-BB, IGF, ITA
15	1% FBS, ZKT-I, EGF, IGF, ITA

Dazu wurden Zellen der vierten Passage in 48-Well-Platten bei einer Dichte von 5000 Zellen pro cm^2 ausplattiert und für 10 Tage kultiviert. Zur optimalen Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Cytokinen wurde das Medium dreimal pro Woche gewechselt. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde nach 10 Tagen mittels WST-1 Methode bestimmt. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden jeweils Kulturen in

3. Ergebnisse und Diskussion

ZKT-I-Medium mit 15% Serum bzw. 1% Serum und ITA (Insulin ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), Transferrin ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) und 1% Albumin) in allen 48-Well-Platten mitgeführt.

Abb. 3.30 zeigt die normalisierte metabolische Aktivität der Zellen im Vergleich der eingesetzten Cytokinkombinationen.

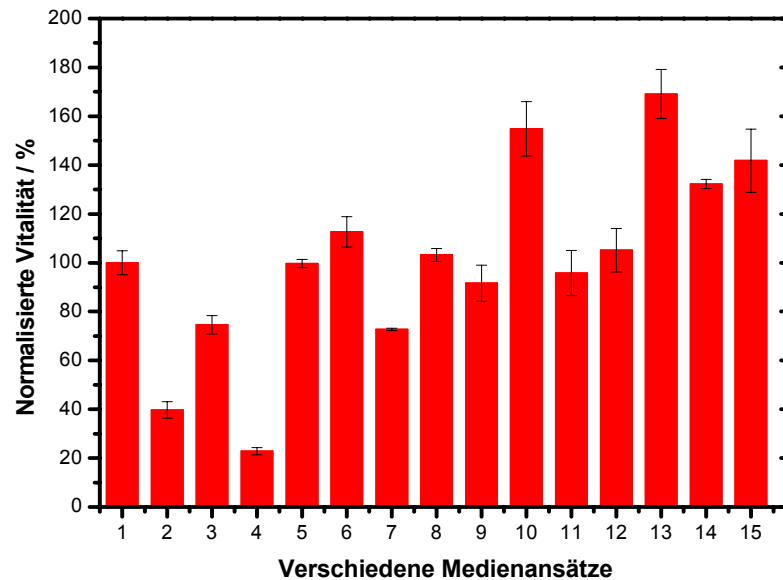


Abb. 3.30: Vitalitätsverhalten osteogener Zellen der vierten Passage, ermittelt mit Hilfe des WST-1-Tests. Cytokinkombination Nr. 13 zeigte die höchste Zellvitalität. Der Wert des Mediums Nr.1 (Positivkontrolle: 15% FBS, ZKT-I) wurde auf 100% normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Parallelkulturen in 48-Well-Platten.

Durch die kombinierte Zugabe von PDGF-BB, EGF und FGF2 (Medium 13) stieg die Vitalität der Zellen im Vergleich zum Kontrollmedium (Nr. 1) am stärksten an. Im Vergleich der einzeln getesteten Wachstumsfaktoren hatte EGF (Medium Nr. 6) den höchsten mitogenen Effekt, gefolgt von FGF2 (Medium Nr. 8) und PDGF-BB (Medium Nr. 9). IGF-I zeigte eine geringe mitogene Wirkung auf die Zellen, obwohl er eine wichtige Rolle als autokriner und parakriner Regulator der Osteoblastenfunktion spielt [Hock et al., 1988]. Die geringe Wirkung des IGFs auf das Zellwachstum könnte auf die hohe Insulinkonzentration in der Kultur zurückzuführen sein, wobei IGF-I eine große strukturelle Homologie zu Insulin (bzw. Proinsulin) aufweist und dieses in hohen Konzentrationen auch an den IGF-I-Rezeptor zu binden vermag. Das Basalmedium (Nr. 4) allein erwies sich wie zu erwarten als unzureichend für den Erhalt der Zellvitalität. Dies lag auch an der schlechten Anheftung der Zellen bedingt durch den Mangel an Anheftungsfaktoren, wie sie in Serum vorhanden sind, und hatte eine Ablösung bzw. das Absterben der Zellen zur Folge. Deshalb konnte nicht völlig auf Serum verzichtet werden, sondern es wurde lediglich auf 1% reduziert.

3. Ergebnisse und Diskussion

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Kombination von PDGF-BB, EGF und FGF2 auf osteogene Kaninchenzellen wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, wobei die Proliferation der Zellen diesmal durch Zellzählung nach Trypanblau-Färbung ermittelt wurde. Die Zellen wurden hierzu in T25-Kulturflaschen mit einer Anfangsdichte von 5000 Zellen pro cm^2 kultiviert. Die verschiedenen Medienkombinationen wurden wie in Tab. 3.4 zusammengefasst mit osteogenen Supplementen eingesetzt. Zweimal pro Woche wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Nach fünf Tagen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mittels Trypsinlösung von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst. Die in PBS vorverdünnte Zellsuspension wurde mit Trypanblaulösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (Abb. 3.31). Die Standardabweichung wurde aus jeweils zwei T25-Kulturflaschen ermittelt.

Tab.3.4: Auflistung der verschiedenen Medienansätze. Als Positiv- und Negativkontrolle wurde jeweils der Ansatz Nr.1 bzw. Nr.2 angenommen. Alle Cytokine wurden in einer Konzentration von $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ eingesetzt. ITA: Insulin, Transferrin und Albumin; OS: osteogene Supplemente.

Medium	
1	ZKT-I + 15% FBS + OS
2	ZKT-I + 1% FBS + ITA + OS
3	ZKT-I + 1% FBS + ITA + EGF + OS
4	ZKT-I + 1% FBS + ITA + FGF2 + EGF + OS
5	ZKT-I + 1% FBS + ITA + EGF + PDGF-BB + FGF2 + OS
6	ZKT-I + 1% FBS + ITA + PDGF-BB + EGF + OS

Wie in Abb. 3.31 zu beobachten ist, war die Zellzahl in Kulturmedium Nr. 5 (EGF/ PDGF-BB / FGF2) deutlich höher als in allen anderen Kulturen.

3. Ergebnisse und Diskussion

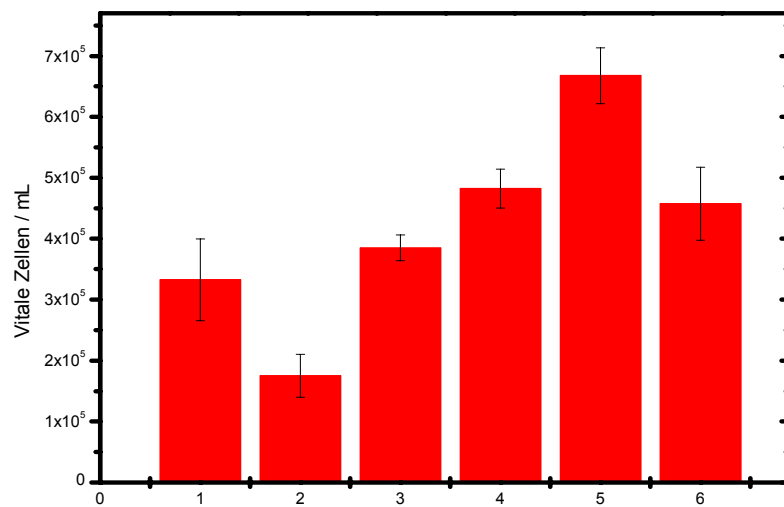


Abb. 3.31: Proliferation von Kaninchenzellen der vierten Passage in Medien mit unterschiedlichen Cytokinkombinationen. Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Methode. Die Standardabweichung wurde aus jeweils zwei T25-Kulturflaschen ermittelt.

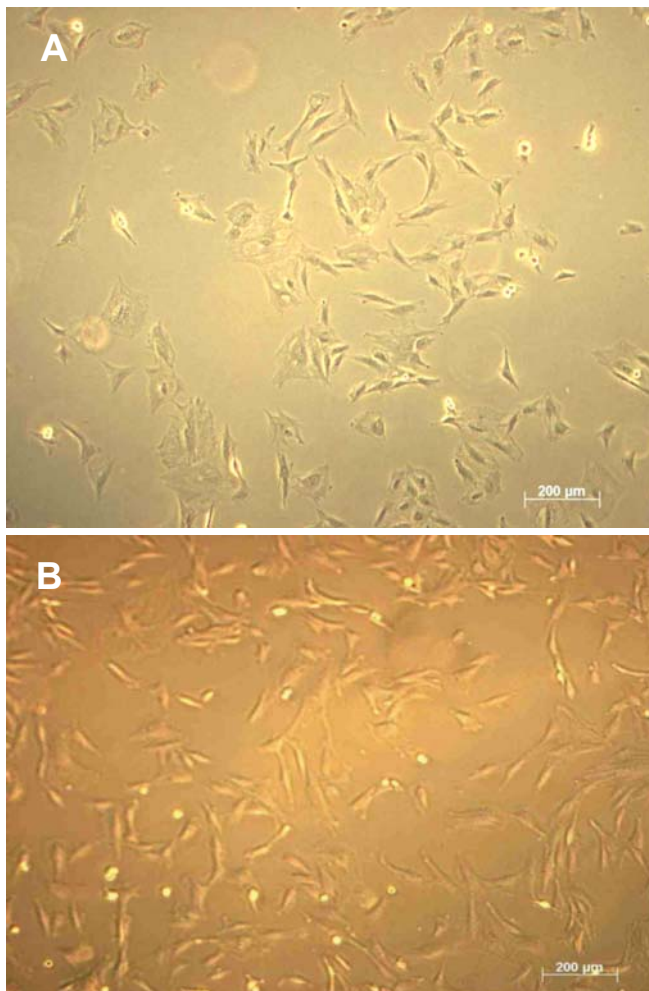


Abb. 3.32: Morphologie der Zellen nach dreitägiger Kultur mit 10% FBS (**A**) oder in Medium mit Zusatz von Cytokinen (EGF, PDGF-BB, FGF2) (**B**). Die Zellen im serumreduzierten Medium zeigten vorwiegend einen gestreckten Fibroblasten-Phänotyp während die mit 15% FBS kultivierten Zellen vorwiegend einen flächigeren Phänotyp zeigten.

3. Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend wurde deutlich gezeigt, dass eine Kombination von Dexamethason, β -Glycerophosphat, Ascorbinsäure, EGF, PDGF-BB und FGF2 die Proliferation von Knochenvorläuferzellen des Kaninchens am besten stimulierte. Für die Zellkultivierung in Medium mit Cytokinen stellte sich eine Aussaatdichte von 5000 Zellen pro cm^2 als optimal heraus (Daten nicht gezeigt). Die Zellen zeigten im o.g. Medium die höchste Proliferationsrate und erreichten ca. 200% der Kontrolle (ZKT-I + 15% FBS + OS). Die Wirkung verschiedener Cytokinkombinationen auf unterschiedliche Kulturmodelle wie z.B. humane Knochenmarkzellen [Chaudhary et al., 2004; Reyes et al., 2001] und Rattenzellen [Barthold, 2003] sind ausgiebig in der Literatur beschrieben, die optimale Cytokinkombination für Kaninchenzellen wurde allerdings erstmals in dieser Arbeit untersucht.

Nachdem geklärt werden konnte, dass sich der eingesetzte Cytokin-Cocktail positiv auf das Proliferationsverhalten der Zellen auswirkt, ergab sich als nächste Frage inwieweit diese Cytokine die Differenzierung und Mineralisierung der Zellen beeinflussen können. Hierzu wurde eine weitere Kinetik, wie im nächsten Kapitel (3.2.3) beschrieben, durchgeführt.

3.2.3. Proliferation, Differenzierung und Mineralisierung osteogener Zellen im optimierten Medium

Zur Untersuchung der Differenzierung der Kaninchenzellen im optimierten Medium wurde eine Langzeitkultur über 30 Tage durchgeführt. Dabei wurden die Zellproliferation und -differenzierung sowie die Mineralisierung der extrazellulären Matrix bestimmt. Die Zellen wurden in 48-Well-Platten mit einer Dichte von 5000 Zellen pro cm^2 ausgesät. Medienwechsel erfolgten dreimal pro Woche. Bis zum siebten Tag wurden die Zellen in Proliferationsmedium (ZKT-I, 1% FBS, EGF, FGF2, PDGF-BB, Insulin, Transferrin, Albumin, 1% Pen/Strep, 0,2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, 10 nM Dexamethason) kultiviert, danach wurde das Medium durch Differenzierungsmedium ohne Cytokinzusatz (FGF2, EGF und PDGF-BB) ersetzt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.3.1. Einfluss der Cytokinkombination auf die Proliferation

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe des WST-1-Tests bestimmt. Wie in Abb. 3.33A zu sehen ist, erreichten die Zellen in beiden Kulturanätzen nach achttägiger Proliferation die maximale Vitalität, danach war die metabolische Aktivität wieder leicht rückläufig. Dies ging einher mit der Abnahme der Lactatkonzentration ab Tag 12 (für serumreduziertes Medium) bzw. ab Tag 14 (für serumhaltiges Medium). Durch den Zusatz von Cytokinen wurde trotz geringerer Serumkonzentration eine Erhöhung der metabolischen Aktivität festgestellt. Der Verlauf des Gesamtproteingehalts wurde mittels BCA-Methode bestimmt (Abb. 3.33B). Dabei zeigte es sich, dass der Gesamtproteingehalt in serumreduziertem Medium nach 12 Tagen das Maximum erreichte. Danach folgt bis zum 21. Tag eine Art Plateauphase (wenn man den Wert am Tag 14 übersieht), bevor die Proteinkonzentration wieder deutlich absinkt. Ein Anstieg der Konzentration des Gesamtproteins in serumhaltigem Medium wurde über 23 Tage erreicht, danach sinkt sie wieder ab. Die Abnahme der Gesamtproteinkonzentration in beiden Medien weist daraufhin, dass die Zellen abstarben. Die auch über Tag 14 hinaus zunehmende LDH-Aktivität im Kulturüberstand (Abb. 3.33D), die erst an Tag 21 bzw. 23 ihr jeweiliges Maximum erreichte, bestätigt die auf die Gesamtproteinbestimmung begründete Hypothese eines vermehrten Absterbens der Zellen. Interessant ist die starke Abnahme des Gesamtproteingehalts in serumreduziertem Medium gegenüber dem serumhaltigen Medium. Diese Ergebnisse stimmen mit denjenigen überein, die in unserer Arbeitsgruppe in Versuchen mit osteogenen Humanzellen gewonnen wurden [Majore, 2005] und weisen darauf hin, dass in serumhaltigem Medium Serumproteine wie z.B. Albumin, Fibronectin [Boskey, 1991] von der ECM absorbiert und dort eingelagert werden, was die zum Ende höheren Werte an Gesamtprotein in serumhaltigen Kulturen erklärt.

3. Ergebnisse und Diskussion

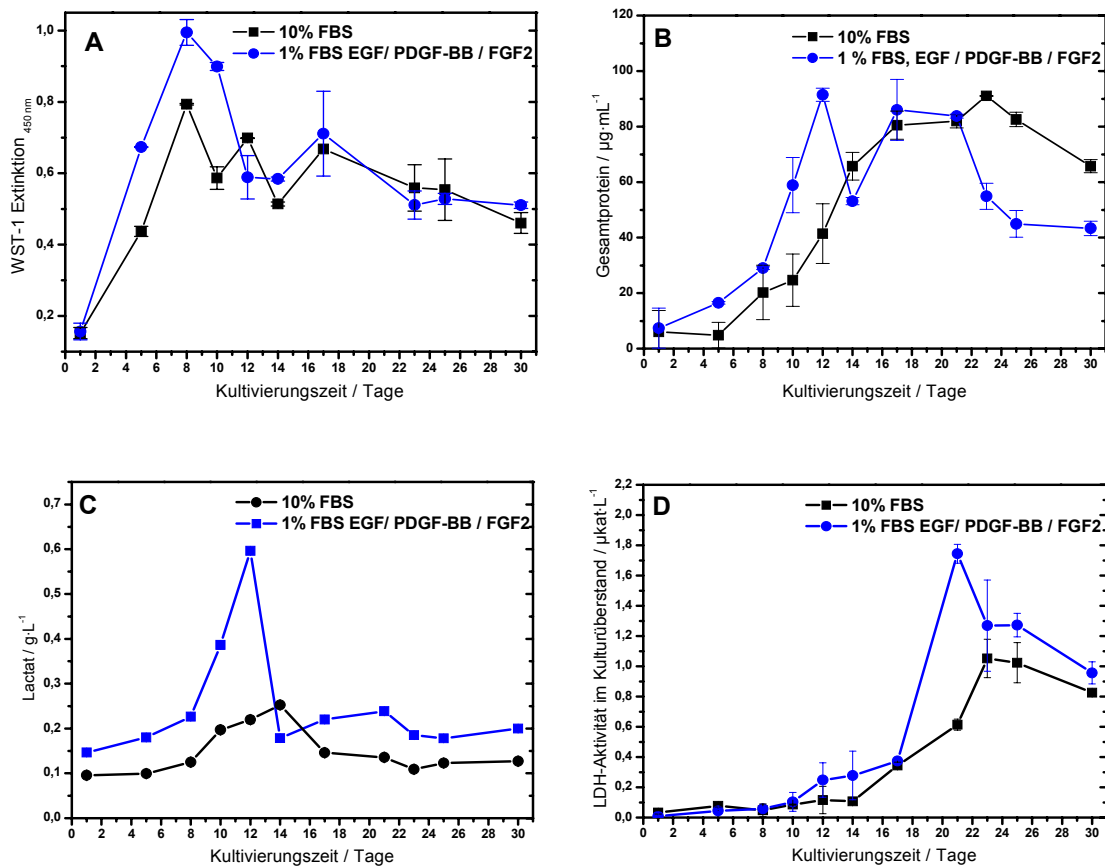


Abb. 3.33: Vergleichende Langzeitkultivierung (30 Tage) von osteogenen Kaninchenzellen der vierten Passage in verschiedenen Kulturmedien (serumhaltig ohne Cytokine sowie serumreduziert mit Cytokinen). Dargestellt sind: metabolische Aktivität (Vitalität) mittels WST-1 (A), Gesamtprotein (B), Lactatkonzentration (C) und LDH-Aktivität (D). Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Parallelkulturen in 48-Well-Platten.

Die Erhöhung der LDH-Aktivität wies auf eine verstärkte Zellyse hin, welche wiederum mit einer geringeren Gesamtproteinkonzentration sowie Lactatbildungsrate in Verbindung gebracht werden kann. Das Absterben der Zellen könnte an der Apoptose differenzierter Zellen liegen. Diese wurde allerdings nicht analytisch erfasst. *In vivo* differenzieren nur 35% der reifen Osteoblasten zu Osteocyten und *Bone Lining Cells*, die restlichen Zellen unterliegen der Apoptose [Manolagas, 2000]. Dies erklärt die erhöhten LDH-Werte in beiden Ansätzen während der Mineralisierungsphase (s.o.).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.3.2. Einfluss der Cytokinkombination auf die Differenzierung

Als repräsentativer Parameter für die Phase der Matrixreifung wurde die Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase, das als frühes Marker von Osteoblasten angesehen wird, bestimmt (Abb. 3.34). Innerhalb der ersten sieben Tage war in den Cytokin-supplementierten Kulturen keine AP-Aktivität feststellbar (im Vergleich zu einem geringen Aktivitätsanstieg in den mit 10% FBS durchgeführten Experimenten). Nach der Entfernung der Cytokine (PDGF-BB / FGF2 / EGF) aus der Kultur, gelang ein Nachweis der AP nach zehn Tagen. Im weiteren Verlauf stieg die AP-Aktivität gegenüber der Referenzkultur um ca. vier Tage verzögert - bis zum 17. Tag deutlich an. Danach zeigten beide Kulturen einen fast identischen Differenzierungsprozess, wobei die AP-Aktivität zunächst auf konstant hohem Niveau blieb. Anschließend fiel sie nach 23 Tagen wieder ab. Diese Abnahme deutete auf das Einsetzen der Matrixmineralisierung hin, was durch die gleichzeitig einsetzende Calciumeinlagerung in die Extrazelluläre Matrix bestätigt wurde (Abb. 3.36).

Zusammenfassend wurde deutlich gezeigt, dass die eingesetzten Cytokine die Differenzierung der osteogenen Zellen verzögerten. PDGF-BB / EGF / FGF2 ergaben ein verstärktes Wachstum der osteogenen Zellen aber sie spielten letztendlich keine Rolle in der Differenzierung.

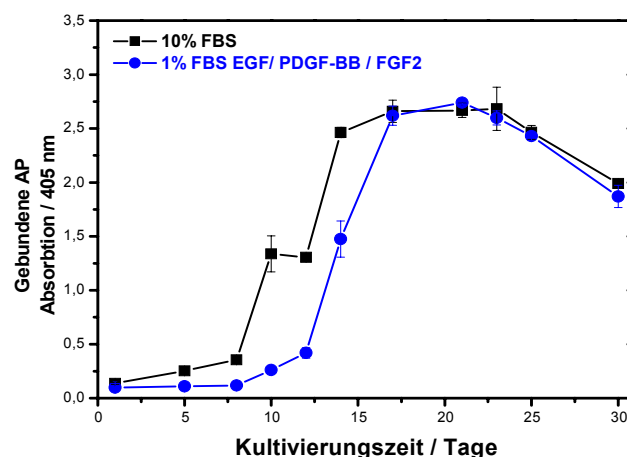


Abb. 3.34: Vergleichende Langzeitkultivierung (30 Tage) von osteogenen Kaninchenzellen der vierten Passage in verschiedenen Kulturmedien (serumhaltig ohne Cytokine sowie serumreduziert mit Cytokinen). Aktivität der membrangebundenen Alkalischen Phosphatase. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Parallelkulturen in 48-Well-Platten.

Osteocalcin, das als charakteristischer und wichtiger Marker der späten Differenzierungsphase während der Knochenbildung bekannt ist [Lee et al., 2000],

3. Ergebnisse und Diskussion

wurde daher ebenfalls innerhalb dieses Experiments bestimmt. Dazu wurde Überstand aus beiden unterschiedlichen Kulturen (mit und ohne Cytokine) entnommen und bis zur Messung bei -70°C gelagert. Die Bestimmung erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Gla-type Osteocalcin ELISA.

Anhand der in Abb. 3.35 dargestellten Ergebnisse dieses Experiments lassen sich folgende Unterschiede beobachten. Nach 14 Tagen konnte eine Osteocalcinmenge von $6,27 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ bei 10% FBS bzw. $0,77 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ bei den Cytokin-supplementierten Kulturen berechnet werden. Zwischen 14 und 17 Tagen stieg die Osteocalcinmenge rapide an und erreichte ein in beiden Medien fast gleiches Maximum von $17,74 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nach einer Plateauphase zwischen 17 und 21 Tagen nahmen die Konzentrationen anschließend wieder deutlich ab, wobei eine Calciumakkumulation beobachtet wurde (s. 3.2.3.3). In Experimenten mit osteogenen Rattenzellen verlief die Konzentration von Osteocalcin mit der Calciumeinlagerung parallel [Hauschka et al., 1989]. Dies konnte für osteogene Kaninchenzellen so nicht bestätigt werden. Das Maximum der Osteocalcinexpression erfolgte zu einem Zeitpunkt, zu dem die Mineralisierung erst begann und lässt vermuten, dass Osteocalcin eine Rolle bei der Initiierung des Mineralisierungsprozesses bei osteogenen Kaninchenzellen spielt.

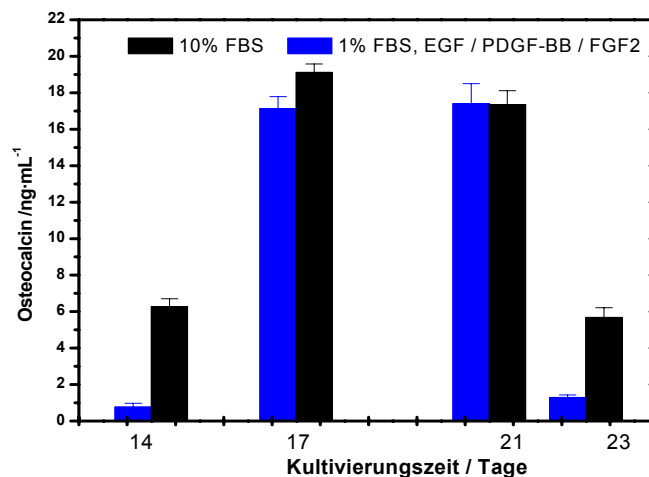


Abb. 3.35: Vergleichende Langzeitkultivierung (30 Tage) von osteogenen Kaninchenzellen der vierten Passage in verschiedenen Kulturmedien (serumhaltig ohne Cytokine sowie serumreduziert mit Cytokinen). Quantitativer Nachweis der Expression von Osteocalcin in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.3.3. Einfluss der Cytokinkombination auf die Mineralisierung

Die Bestimmung des Calciums in der Kultur gibt Hinweise auf die Knochenbildung. Für dieses Experiment wurde der Farbstoff Calcein, der mit Calciumphosphateinlagerungen in Wechselwirkung tritt, bestimmt. Die Zellen wurden in den 48-Well-Platten mittels Ethanol fixiert, mit Calcein-Farbstofflösung überschichtet und übernacht bei 4°C gelagert. Die Einlagerung von Calciumphosphaten in die extrazelluläre Matrix (Abb. 3.36) begann bei beiden Medien nach 21 Tagen, stieg bis zum Tag 25 stark an und erreichte anschließend ein Plateau. Diese Ergebnisse lassen sich mit fluoreszenzmikroskopischen Bildern (Abb. 3.37) gut korrelieren.

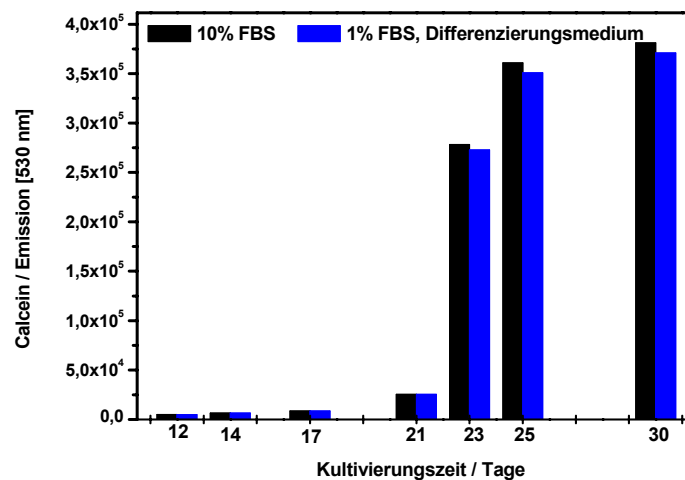


Abb. 3.36: Vergleichende Langzeitkultivierung (30 Tage) von osteogenen Kaninchenzellen der vierten Passage in verschiedenen Kulturmedien (serumhaltiges Medium ohne Cytokine sowie serumreduziertes Differenzierungsmedium). Entwicklung der Calcein-Fluoreszenz als Indikator für die Mineralisierung.

Histologisch konnten die als Nodules bezeichneten knochenähnlichen Strukturen durch die Wechselwirkung der Calciumeinlagerung mittels des Farbstoffs Calcein unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Es wurde kein großer Unterschied hinsichtlich der Mineralisierung der Zellen in beiden Kulturen beobachtet.

3. Ergebnisse und Diskussion

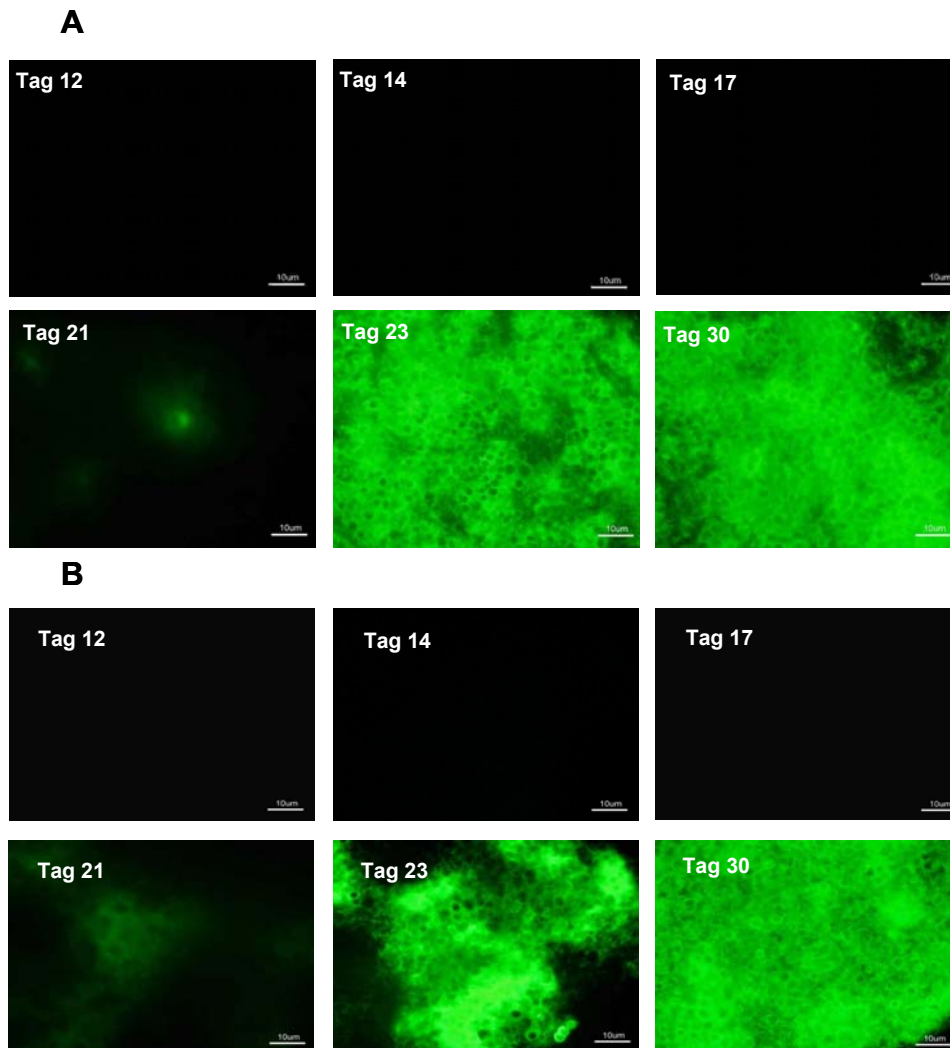


Abb. 3.37: Nodules lassen sich durch die Umsetzung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein mittels Fluoreszenzmikroskopie in serumhaltigem Medium (**B**) und serumreduziertem Differenzierungsmedium (**A**) beobachten.

Zusammenfassend weisen die in Kapitel 3.2 beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass die Kombination der Cytokine EGF, PDGF-BB und FGF2 die Proliferation von osteogenen Kaninchenzellen begünstigt. Es ist aber anzumerken, dass der Einfluss von Cytokinen auf osteogene Zellen sehr stark von Spezies zu Spezies variiert. Barthold zeigte in seiner in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Arbeit [Barthold, 2003], dass die Kombination der drei Cytokine FGF2, PDGF-BB und EGF zu keiner Steigerung der Vitalität osteogener Rattenzellen führte. Hingegen resultierte die Kombination von FGF2 und PDGF-BB ohne EGF in einem starken mitogenen Effekt. Für die Proliferation humaner Knochenvorläuferzellen aus einer heterotopen Ossifikation dagegen erwies sich ein serumreduziertes Medium mit EGF und PDGF-BB als optimal [Majore, 2005].

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für primäre osteogene Vorläuferzellen der Ratte [Barthold, 2003] ist EGF als förderlich für die Proliferation einer osteogenen Rattensarkomzelllinie sowie von Osteoblasten-reichen Rattenkalvarienzellen beschrieben [Ng et al., 1983a], was die vorliegenden Daten unterstützt. Allerdings unterdrückt EGF gleichzeitig die osteogene Differenzierung, was sich in der Inhibierung der Kollagensynthese und der Reduzierung der Alkalischen Phosphatase Aktivität äußert [Hata et al., 1984; Canalis und Raisz, 1979]. Deswegen wurden die Cytokine nach sieben Tagen weggelassen, um die anschließende Differenzierung von Knochenvorläuferzellen des Kaninchens zu ermöglichen.

Im Vergleich zur Positivkontrolle (10% FBS) war der Mineralisierungsprozess kultivierter osteogener Kaninchenzellen in serumreduziertem Medium sehr ähnlich, wie auch anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden konnte (s. 3.2.3.3). Deshalb wurde die Kombination der Cytokine EGF, PDGF-BB und FGF2 ausgewählt und für die 3D-Kultivierung osteogener Kaninchenzellen eingesetzt. Serum konnte jedoch aufgrund der darin enthaltenen, essentiellen Adhäsionsproteine lediglich auf 1% reduziert werden.

3.3. Kultivierung osteogener Kaninchenzellen in serumreduziertem Medium unter Zusatz von Perfluorcarbon-Emulsionen

Bei der *in vitro* Generierung hochvitaler Implantate ($> 1 \text{ cm}^3$) im Bioreaktor ist neben einem geeigneten Trägergerüst, eine ausreichende Oxygenierung innerhalb des Trägers von großer Wichtigkeit. Insbesondere bei der Kultivierung von besiedelten Trägergerüsten mit höherer Besiedlungsdichte ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung innerhalb des Trägers eine Herausforderung. Um eine Sauerstofflimitierung verhindern zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit der Universität Ulm eine Perfluorcarbon-Emulsion (PFC (80% F-Tributylamin)), als Sauerstoffträger getestet werden. Die Löslichkeit von Sauerstoff in PFC ist etwa 50-mal höher als in Blutplasma [Röhlke et al., 1999], wobei PFC völlig inerte Eigenschaften aufweisen und somit keine cytotoxischen Eigenschaften besitzen sollten. Um Adhäsion und Proliferation osteogener Kaninchenzellen in Gegenwart der PFC-Emulsion zu überprüfen, sollte eine 2D-Kultur in T-Flaschen durchgeführt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Osteogene Kaninchenzellen wurden in 24-Well-Platten in einer Dichte von 10.000 Zellen pro cm^2 in serumreduziertem Medium (ZKT-I-Medium mit 1% Serum, FGF2, PDGF-BB, EGF (je $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), Insulin ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Transferrin ($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) und Fettsäure-haltiges Rinderserumalbumin $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die Zellschicht mit warmer PBS gewaschen und die osteogenen Zellen anschließend in Serum-reduziertem Medium unter 1:1 Zusatz der PFC-Emulsion (UULM 002 LS442/ # 130) kultiviert. Als Kontrolle wurde das gleiche Medium ohne Zusatz der PFC-Emulsion eingesetzt. Nach 1, 2 und 5 Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. Wie in Abb. 3.38 dargestellt wurden die Zellmorphologie nach 2 Tagen mikroskopisch beobachtet und dokumentiert.

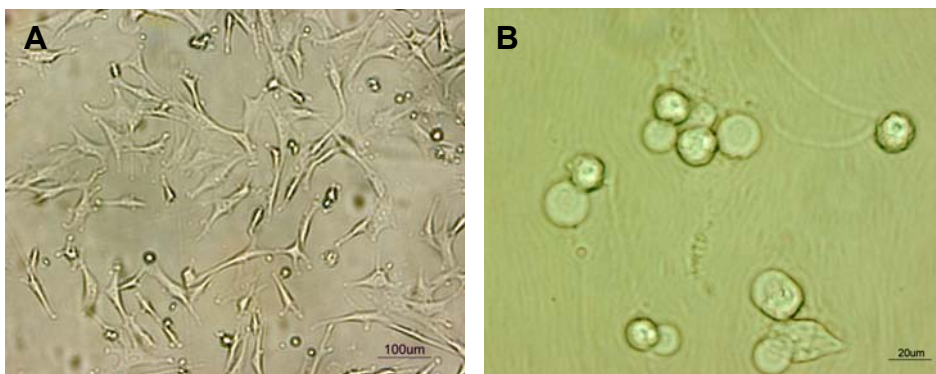


Abb. 3.38: Morphologie osteogener Kaninchenzellen nach 48 Stunden Kultur ohne (A) oder mit (B) Zusatz einer PFC-Emulsion. Die Zellen im serumreduzierten Medium ohne PFC-Emulsion zeigten vorwiegend einen gestreckten Fibroblasten-artigen Phänotyp während die in Gegenwart der PFC-Emulsion kultivierten Zellen einem sphäroiden Phänotyp zeigten, der auf eine deutlich verschlechterte Adhäsion zurückzuführen ist.

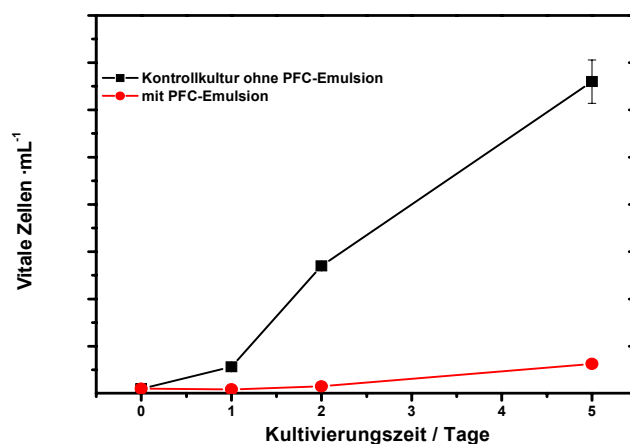


Abb. 3.39: Proliferation osteogener Kaninchenzellen während der Kultivierung in Serum-reduziertem Medium (Kontrolle) und in Serum-reduziertem Medium unter Zusatz einer PFC-Emulsion.

3. Ergebnisse und Diskussion

Wie die Ergebnisse (Abb. 3.38B, 3.39) beweisen, führte die Kultivierung osteogener Kaninchenzellen in Gegenwart der PFC-Emulsion zu einer wesentlich schlechteren Adhäsion und geringerem Wachstum. Diese deutliche Verschlechterung der Kultivierungsbedingungen durch die PFC-Emulsion überwog jeglichen potentiell positiven Einfluss bei der 3D-Kultivierung osteogener Kaninchenzellen zur Vermeidung einer Hypoxie. Folgerichtig wurde die PFC-Emulsion in weiteren Experimenten nicht mehr zum Einsatz gebracht.

3.4. Dreidimensionale Kultivierung

Für die Untersuchungen zur 3D-Kultivierung wurden kubische Camceram- sowie zylindrische Osteoscaf-Träger mit Zellen der vierten Passage besiedelt. Für alle folgenden Versuchen wurden die Trägergerüste zunächst routinemäßig sterilisiert und über 24 Stunden in Kulturmedium vorinkubiert. 10^7 Zellen pro Trägergerüst (als ideale Ausgangsdichte für Kaninchenosteoblasten; s. 3.4.1.1) wurden in einem Gesamtvolumen von 400 μL (für Camceram) oder 300 μL (für Osteoscaf) gleichmäßig auf jeden Träger verteilt. Um Cluster-artiges Wachstum von Zellen innerhalb des Trägergerüsts zu vermeiden, wurden die Zellen zuvor über ein Sieb (70 μm Maschenweite, Becton Dickinson) vereinzelt. Danach wurde die Besiedlung vorsichtig durch tropfenweises Auftragen auf die jeweils gegenüberliegenden Flächen des Trägers vorgenommen [Barthold, 2003]. Zur Adhäsion der Zellen wurden die besiedelten Trägergerüste für 90 Minuten in 24-Well-Platten im Brutschrank bei 12,5% CO_2 -Atmosphäre und 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Trägergerüste vorsichtig in 15-mL-Röhrchen, gefüllt mit 10 mL Kulturmedium, überführt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Das sich anschließende Kultivierungsexperiment wurde dann entweder statisch, dynamisch oder im Bioreaktor durchgeführt.

3.4.1. Statische Kultur

3.4.1.1. Untersuchung der Besiedlungsdichte

Zur Untersuchung des Proliferations- und Differenzierungsverhalten osteogener Kaninchenzellen hinsichtlich ihrer knochenbildenden Eigenschaften sollte zuerst die optimale Besiedlungsdichte zum Wachstum der Zellen untersucht werden. Als Trägermaterial dienten die Camceram-Trägergerüste aus einem HA/ β -TCP-Gemisch. Nach der Sterilisation wurden die Trägergerüste zunächst über Nacht in Kulturmedium inkubiert. Das Medium wurde anschließend wieder abgesaugt, die Trägergerüste einzeln in 24-Well-Platten überführt und mit zwei verschiedenen Besiedlungsdichten ($6 \cdot 10^6$ bzw. $1 \cdot 10^7$ Zellen pro cm^3) besiedelt. Anschließend wurden die Platten im Begasungsbrutschrank bei 12,5% CO_2 und 37°C inkubiert. Nach ca. 90 Minuten wurden die Trägergerüste in 50-mL-Röhrchen mit 30 mL Serum-reduziertem Proliferationsmedium überführt. Der Medienwechsel erfolgte zweimal pro Woche. Nach 7 Tagen Kultivierung erfolgte durch Weglassen der

3. Ergebnisse und Diskussion

Cytokine (PDGF-BB, EGF, FGF2) ein Wechsel auf das Differenzierungsmedium um eine Differenzierung der Zellen zu ermöglichen.

Der Kultivierungsprozess wurde analytisch begleitet. Aus den Kulturüberständen wurden Proben genommen und bei -20°C bis zur Messung zwischengelagert. Als Stoffwechselfparameter wurde die Lactatbildungsrate bestimmt. Außerdem wurden die LDH-Aktivität und die lösliche Alkalische Phosphatase im Überstand gemessen. Anschließend wurde die metabolische Aktivität (Vitalität) der Zellen nach 10 Tagen mittels des WST-1-Tests bestimmt. Es wurden pro Besiedlungsdichte zwei Camceram-Trägergerüste kultiviert. Die Ergebnisse des Experiments sind im Folgenden graphisch dargestellt.

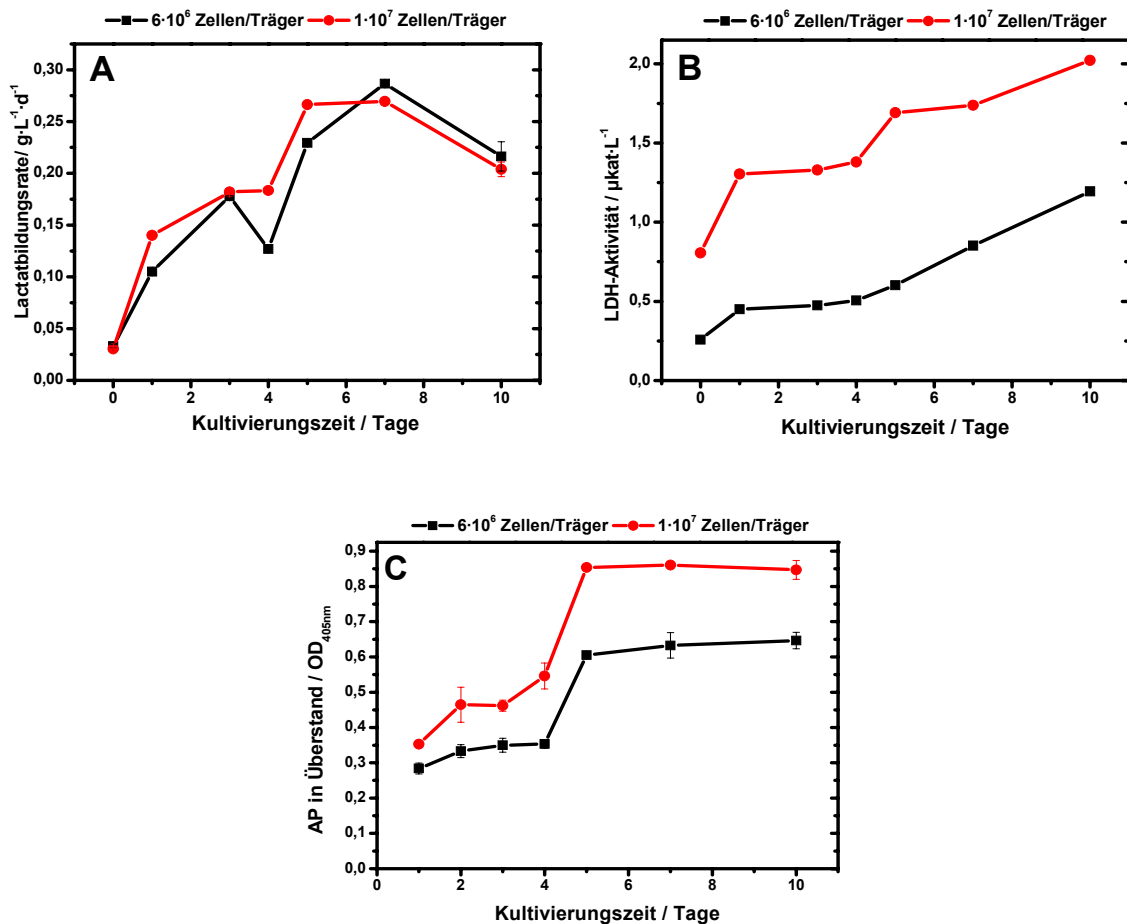


Abb. 3.40: Vergleich der Zellproliferation bei unterschiedlichen Besiedlungsdichten auf Camceram in statischer Kultur. Lactatbildungsrate (A), LDH-Aktivität (B) und lösliche Alkalische Phosphatase im Überstand (C). Die Standardabweichungen berechnen sich aus jeweils zwei parallel geführten Kulturen.

3. Ergebnisse und Diskussion

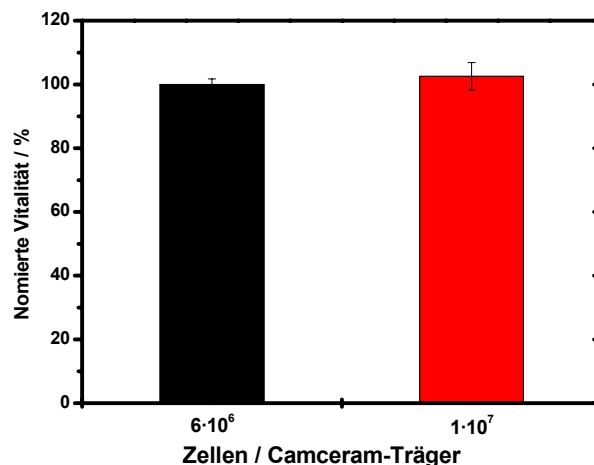


Abb. 3.41 : Vitalitätsbestimmung der Zellen in statischer Kultur nach 10 Tagen Kultivierung (WST-1-Test; mit $6 \cdot 10^6$ Zellen beimpfter Gerüstträger normiert auf 100%). Die Standardabweichungen berechnen sich aus jeweils zwei parallel geführten Kulturen.

Lactat wurde während der Kultivierung in den Überstand sekretiert, wobei die Kulturen mit höher Besiedlungsdichte leicht höhere Lactatmengen in das Medium abgaben, als die mit niedrigerer Besiedlungsdichte (Abb. 3.40A). Bei einer Dichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen pro cm^3 erreichten die Zellen innerhalb von 5 Tagen die maximale Lactatbildungsrate von $0,2665 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Dagegen brauchten die Zellen bei einer Besiedlungsdichte von $6 \cdot 10^6$ Zellen pro cm^3 zwei Tagen länger um das Maximum von $0,28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ zu erreichen. Nach Erreichen der Maxima nahm die volumetrische Lactatbildungsrate in beiden Kulturen wieder leicht ab. Gleichzeitig zeigt Abb. 3.40B eine kontinuierliche Steigerung der LDH-Aktivität mit höheren Werten in den Kulturen der mit $1 \cdot 10^7$ Zellen besiedelten Träger. Die Zellen sind dabei entweder apoptotisch oder nekrotisch gestorben, was mit den gewählten analytischen Methoden nicht eindeutig zuzuordnen war. Es ist allerdings anzumerken, dass in der statischen Zellkultur die Zufuhr von Nährstoffen sowie die Entfernung von Stoffwechselmetaboliten nur durch Diffusion stattfinden können, was insbesondere bei sehr hohen Zelldichten nicht ausreicht um die Zellen in der Tiefe des Trägermaterials adäquat zu versorgen. Demzufolge wäre das Absterben der Zellen in diesen statischen Kulturen hauptsächlich auf nekrotische Prozesse zurückzuführen.

Anhand der Messung der löslichen Alkalischen Phosphatase im Überstand (Abb. 3.40C) wurde beobachtet, dass die Zellen unabhängig von der gewählten Besiedlungsdichte etwa zeitgleich differenzierten. Die Absolutwerte bei höherer

3. Ergebnisse und Diskussion

Besiedlungsdichte waren dabei zu jeder Zeit höher als die bei der niedrigeren Besiedlungsdichte. Dies deutete darauf hin, dass in den mit 10^7 Zellen pro Camceram-Träger besiedelten Kulturen eine Teilpopulation schon weiter im Differenzierungsprozess fortgeschritten war. Nach jeweils 4 Tagen war in beiden Kulturen eine starke Erhöhung der ALP-Aktivität feststellbar. Der relative Verlauf der ALP-Aktivität verlief in beiden Kulturen ähnlich.

Zusammenfassend zeigten die zwei eingesetzten Besiedlungsdichten ($6 \cdot 10^6$ bzw. $1 \cdot 10^7$ Zellen pro Camceram-Träger) leichte, aber dennoch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Proliferation. In beiden Trägergerüsten wurden nach 10 Tagen Kultivierung unabhängig von der Besiedlungsdichte fast die gleichen Zellzahlen erreicht (s. Abb. 3.41). Dabei stellte sich aber heraus, dass eine Besiedlungsdichte von 10^7 zu einer schnelleren Differenzierung und damit zu einer insgesamt verkürzten Kultivierungszeit führen kann. Diese reduziert wiederum die Medienkosten sowie den Zeitaufwand für die Analytik. Aus diesem Grund wurde für spätere Versuchsreihen eine Ausgangsdichte von 10^7 Zellen pro Trägergerüst ausgewählt. Dies schließt jedoch nicht aus, dass auch eine niedrigere Besiedlungsdichte geeignet ist, wobei sich eine initiale Besiedlungsdichte von 10^6 Zellen pro cm^3 in den Untersuchungen von Holy et al. als optimal für der Kultivierung ähnlicher osteogener Zellen gezeigt hat [Holy et al., 2000b].

Nachdem die Proliferationskapazität der Zellen durch die analytischen Daten bestätigt werden konnte, war es von Bedeutung auch die Anheftung und Morphologie der Zellen bei der ausgewählten Besiedlungsdichte von 10^7 Zellen pro Träger auf der Oberfläche bzw. in den Poren des Camceram-Trägers zu beurteilen. Dazu wurden Parallelexperimente durchgeführt, in denen die Kolonisierung der Zellen auf statisch kultivierten Camceram-Gerüsten untersucht wurde. Die Zellen wurden dabei in Serum-reduziertem Proliferationsmedium über maximal 10 Tage kultiviert. Nach 7 Tagen Kultivierung erfolgte durch Entfernung der Cytokine der übliche Wechsel auf das Serum-reduzierte Differenzierungsmedium. Nach 24 Stunden sowie 10 Tagen Kultivierung wurden die Gerüste jeweils fixiert und für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen vorbereitet.

3. Ergebnisse und Diskussion

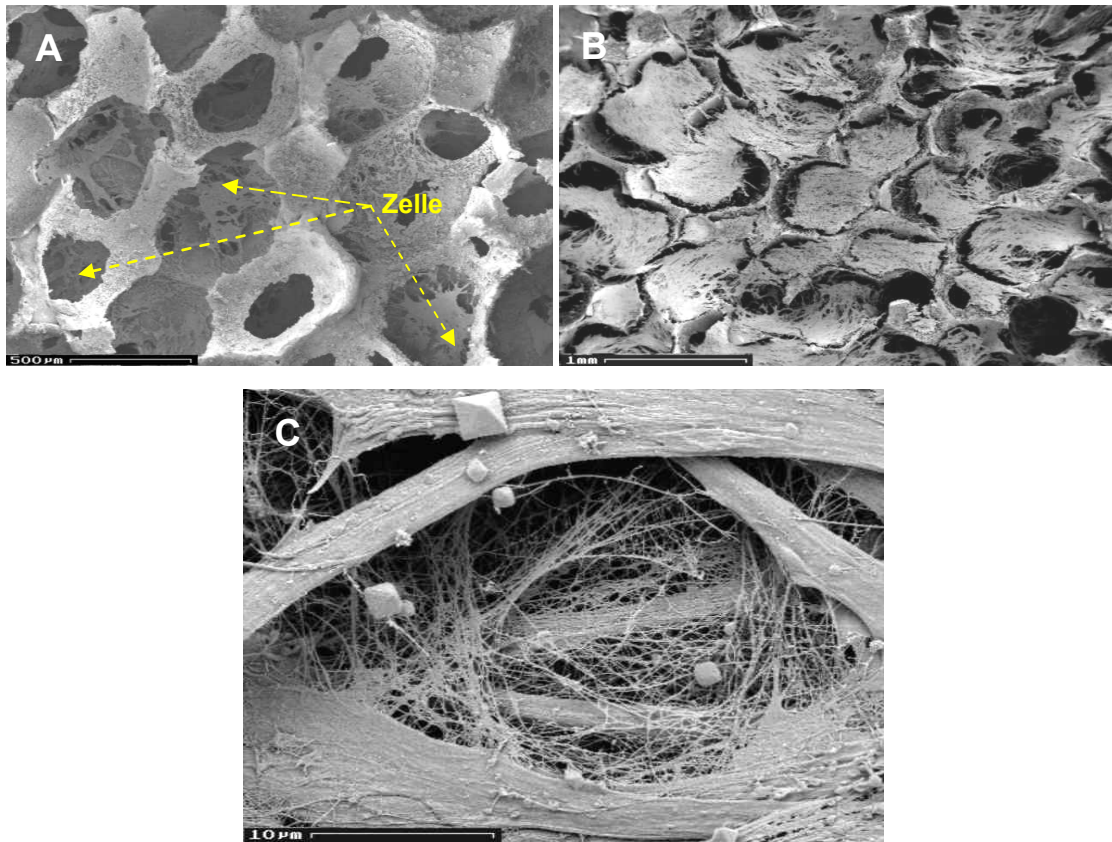


Abb. 3.42: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen osteogener Kaninchenzellen, die in Serum-reduziertem Medium statisch kultiviert wurden. **A:** Camceram nach 24 h Besiedlung; **B:** Camceram nach 10 Tagen; **C:** Gebildete Kollagenfibrillen nach 10 Tagen Kultivierung.

In Abb. 3.42A ist zu beobachten, dass die Zellen nach 24 Stunden Kultivierung auf den Träger anhafteten. Sie hatten ein Netz in den Poren der Camceram-Träger gebildet und wuchsen innerhalb von 10 Tagen auch in der Tiefe der Poren zu hohen Dichten (Abb. 3.42B). Des Weiteren spreiteten sich die Zellen aus und produzierten ein Netzwerk von Kollagenfibrillen (Abb. 3.42C).

Zusammenfassend ließen die analytischen und histologischen Daten darauf schließen, dass die osteogenen Kaninchenzellen auch morphologisch einen Osteoblasten-spezifischen Phänotyp zeigten. Die dreidimensionale poröse Struktur des Camcerams förderte *in vitro* das Wachstum und die osteogene Differenzierung von Kaninchenzellen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.4.1.2. Zellwachstum auf Camceram und Osteoscaf

Als Basis für die Herstellung des Implantates ist ein geeigneter abbaubarer und resorbierbarer Stützgerüstträger, der dem zu ersetzenden Gewebe hinsichtlich biologischer und biomechanischer Eigenschaften ähnelt, sehr wichtig [Hutmacher, 2000]. Komposite besitzen Vorteile bezüglich der Knochenheilung und Knochenregeneration gegenüber Trägermaterialien aus reinen Polymeren oder Keramik [Elgendy et al., 1993; Kikuchi et al., 2002]. Aus diesen Gründen wurden im Rahmen des EU-Projekts „*Tissue Reactor*“ zwei Kompositmaterialien von den Projektpartnern an der Universität Toronto bzw. BoneTec sowie *Cam Implants* (Camceram (β -TCP-HA) und Osteoscaf (PLGA-CaP) hergestellt um sie für die 3D-Kultivierungen einzusetzen.

Zur Untersuchung der Proliferation osteogener Kaninchenzellen auf diesen zwei Trägergerüsten wurden Zellen der vierten Passage vor dem Beginn von Experimenten im Bioreaktor sowohl auf Camceram als auch auf Osteoscaf unter gleichen Bedingungen zunächst statisch im Brutschrank kultiviert. Dazu wurde jeder Träger mit 10^7 Zellen pro cm^3 besiedelt und 10 Tage statisch in 30 mL Serum-reduziertem Proliferationsmedium inkubiert. Nach fünf Tagen wurde das Medium gewechselt. Als Stoffwechselfparameter wurden die Lactat-Akkumulation sowie LDH-Aktivität in Medium bestimmt. Zum Abschluss der Kultivierung nach 10 Tagen wurde die Zellzahl mit Hilfe der Hoechst-Methode bestimmt.

Unter gleichen Bedingungen wurde parallel die Morphologie der Zellen unter dem Mikroskop untersucht. Zwei Methoden wurden hierfür angewandt: REM und Lichtmikroskopie nach Paraffineinbettung und histologischer Färbung. Die letzte Methode wurde ausgewählt, damit die Struktur des Trägers so erhalten blieb und das Präparat nur eine geringe Schrumpfung aufwies. Trotz des hohen methodischen Aufwands gelang es nach mehreren Vorversuchen ein geeignetes Protokoll zu etablieren. Damit konnten mikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden.

Um das Wachstum der Zellen auf beiden Trägergerüsten vergleichen zu können, musste die Besiedlung der Zellen möglichst unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Wie bereits beschrieben wurden hierzu die Zellen in einem dem Gesamtvolumen des Gerüstträgers angepassten Volumen aufgetragen (2 x 200 μL für Camceram, 2 x 150 μL für Osteoscaf), wobei die Gesamtzellzahl 10^7 Zellen pro Träger entsprach.

3. Ergebnisse und Diskussion

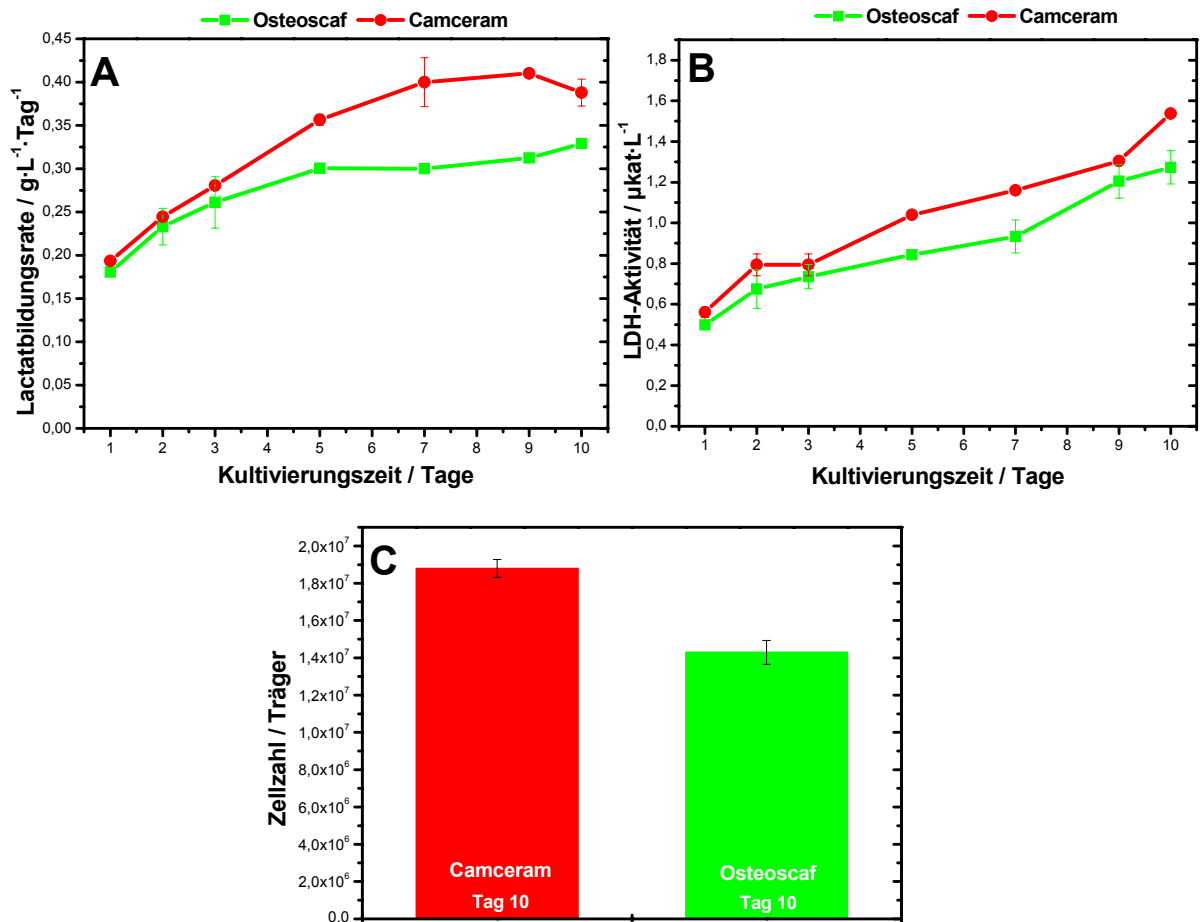


Abb. 3.43: Vergleich der Proliferation osteogener Kaninchenzellen in statischer Kultur auf Camceram (Camimplants) und Osteoscaf (BoneTec). Dargestellt sind die Lactatbildungsraten (A), die LDH-Aktivität in Überstand (B) sowie die Bestimmung der finalen Zellzahl mittels Hoechst 33258 Fluoreszenzfärbung (C). Die Standardabweichungen berechnen sich aus jeweils zwei parallel geführten Kulturen.

Im Vergleich zu den Osteoscaf-Gerüsten konnte auf den Camceram-Gerüsten eine stärkere Proliferation der Zellen festgestellt werden (Abb. 3.43C). Diese Beobachtung wird auch durch die erhöhte Lactatbildungsrate als metabolischem Parameter unterstützt (Abb. 3.43A). Dagegen verliefen die Kurven der LDH-Aktivität bei beiden Kulturen fast identisch (Abb. 3.43B). Da Camceram aufgrund seiner gegenüber Osteoscaf vergrößerten Oberfläche mehr Platz für die osteogenen Zellen in den äußeren Schichten des Gerüstträgers bietet, ergaben sich erwartungsgemäß auch leichte Vorteile bezüglich der Gesamtzellausbeuteproliferation. Insgesamt zeigten die elektronen- und lichtmikroskopischen Aufnahmen, dass sowohl ein

3. Ergebnisse und Diskussion

Zellwachstum als auch die Bildung einer Kollagenmatrix auf beiden Trägergerüsten (Osteoscaf und Camceram) möglich ist (s. Abb. 3.44).

Das Wachstum und die Verteilung der Zellen wurde nach 7 Tagen Kultivierung mit Hilfe von REM und Lichtmikroskopie charakterisiert. Bei den histologischen Untersuchungen wurde die Verteilung der Zellen auf dem Camceram-Träger nur mittels REM untersucht. Eine Paraffineinbettung konnte im Camceram nicht durchgeführt werden, da Camceram aus Calciumphosphat besteht, das zunächst demineralisiert werden müsste. Dieses würde allerdings auch zu einem Verlust des neu gebildeten Knochenminerals führen und wurde deshalb nicht durchgeführt. Dagegen gelang es die wesentlich weiche Osteoscaf-Träger in 5 µm dicke Scheiben zu schneiden.

Um Osteoblasten identifizieren zu können, wurden die Osteoscaf-Schnitte mittels H/E angefärbt. Zellen schienen unter dem Mikroskop blau (Abb. 3.44B1/B2). Im Camceram-Träger ist zu sehen, dass die Zellen schon nach 24 Stunden ein Netz bildeten und ganz tief in den Poren des Trägers wuchsen (Abb. 3.44A1/A2). Nach 10 Tagen Kultivierung spannten die Zellen sich über die Oberfläche des Trägers und bildeten eine Kollagenmatrix (Abb. 3.44A3). Die Zellen im Osteoscaf bildeten ebenfalls eine Kollagenmatrix, die durch Kollagenfärbung bestimmt wurde (dunkelrote Farbe, Abb. 3.44B3).

3. Ergebnisse und Diskussion

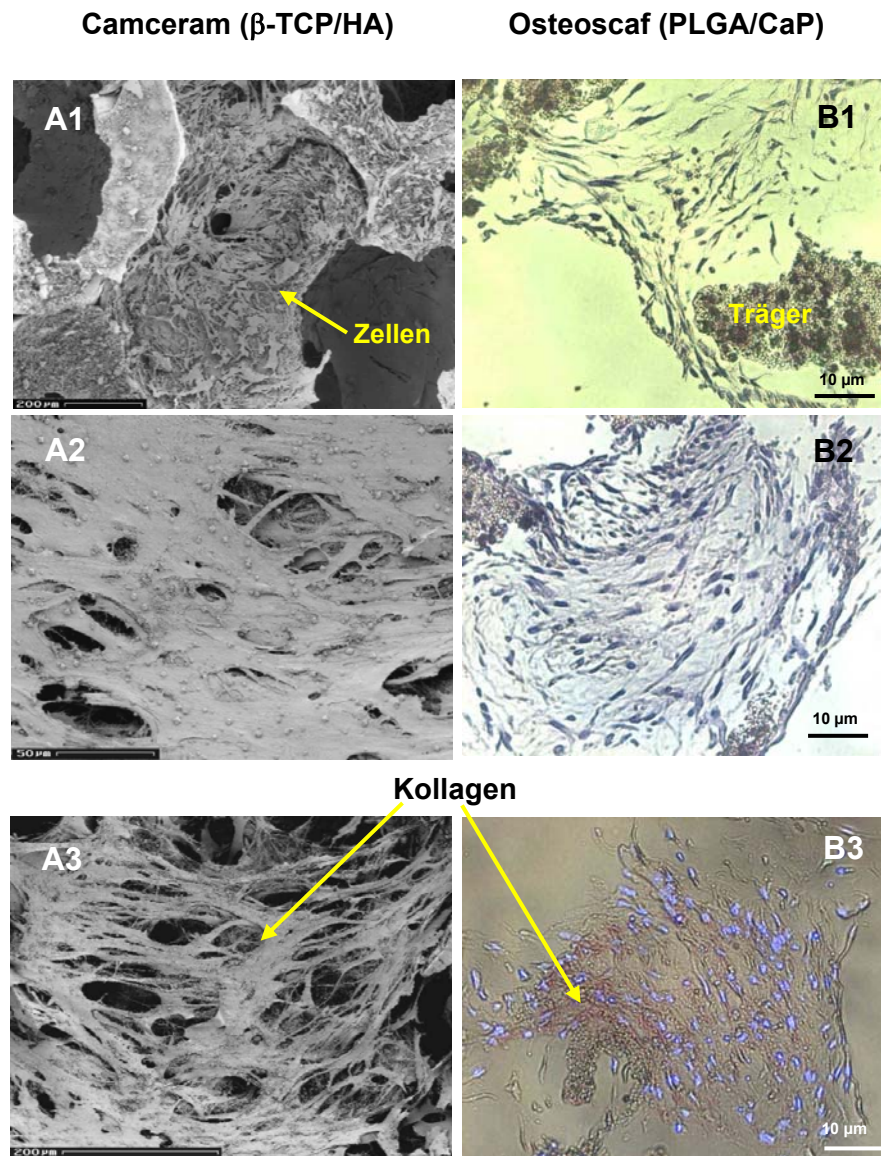


Abb. 3.44: Elektronen- und lichtmikroskopische Aufnahmen statischer Kulturen osteogener Kaninchenzellen auf beiden Trägergerüsttypen (Camceram und Osteoscaf). **A** (Camceram): Zellen haften tief in den Poren an und proliferierten auf dem Träger mit Bildung von Kollagenmatrix (**A2**; **A3**). **B** (Osteoscaf): (**B1**; **B2**) H-E-Färbung osteogener Kaninchenzellen, die sich auf dem Träger ausbreiten. Die Zellkerne wurden durch DAPI blau angefärbt und die Kollagenmatrixfärbung erscheint dunkelrot (**B3**).

In beiden Gerüstträgern konnten eine eindeutige Adhäsion der Zellen und die Bildung einer Kollagenmatrix gezeigt werden. Das Netzwerk der Poren in den Trägergerüsten war nach 10 Tagen mit vielen Zellen gefüllt, wenngleich mit $1,42$ bzw. $1,87 \cdot 10^7$ Zellen die für osteogene Zellen der Ratte ermittelte, mögliche Gesamtzellzahl von mindestens $4 \cdot 10^7$ [Barthold, 2003] deutlich unterschritten wurde. Durch den Einsatz von dynamischen Kultivierungsbedingungen bzw. des Bioreaktorsystems sollte sich dieses Defizit jedoch vermeiden lassen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.4.2. Das Bioreaktorsystem

Im Gegensatz zu statischen 2D-Kulturen, bei denen die Nährstoffversorgung in der Regel unproblematisch verläuft, gibt es bei statischen 3D-Kulturen mit zunehmender Größe des Trägermaterials Beschränkungen Sauerstoff und andere Nährstoffe in ausreichenden Mengen in die Tiefe des Trägergerüsts zu transportieren, was zu einem Absterben der Zellen in diesen Bereichen führen kann. Daher ist für die *in vitro* Langzeitkultivierung von knochenbildenden Kaninchenzellen in 3D-Trägern ein geeignetes Kultursystem von besonderer Bedeutung. Dieses System sollte gegenüber statischen Kulturen unter anderem eine Konvektion von Kulturmedium ermöglichen, so dass an der Trägeroberfläche und im Medium physikalische Scherkräfte auftreten, die das Wachstum und die Differenzierung der Zellen begünstigen [Vunjak-Novakovic et al., 1998; Goldstein et al., 2001; Sikavistas et al., 2002; Baksh und Davies, 2000]. Hierzu gehören Spinnerflaschen- oder Rollerkulturen und auch das an der Universität Toronto entwickelte dynamische 3D-System [Baksh und Davies, 2000]. Das dynamische 3D-System wurde für diese Arbeit einigen signifikanten Modifikationen unterzogen, die seine Leistungsfähigkeit deutlich verbessern sollten, und als ein vereinfachtes Referenzsystem für den Vergleich mit der 3D-Kultur im Bioreaktor eingesetzt (Abb. 3.45A).

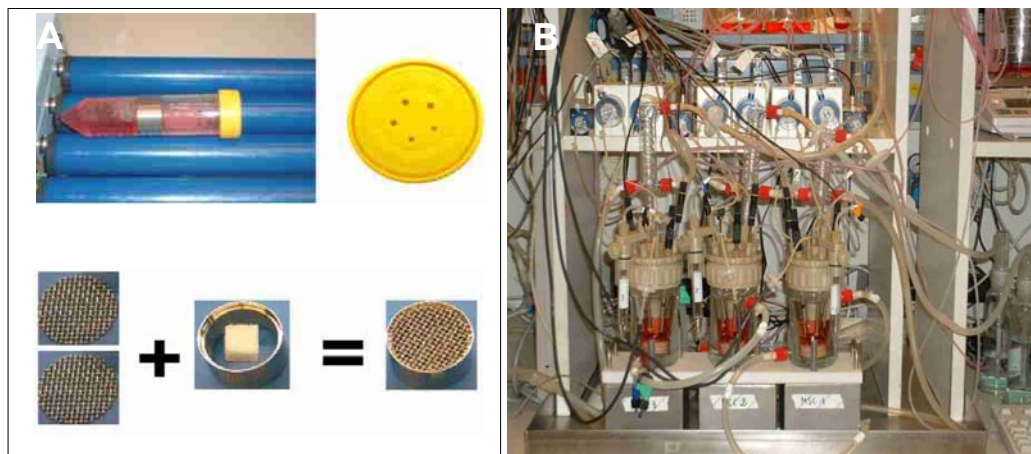


Abb.3.45: Schematische Darstellung des modifizierten dynamischen Systems (A) und des Bioreaktorsystems (B).

Das in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik entwickelte und auch für diese Arbeit eingesetzte Perfusionsbioreaktorsystem geht noch einen Schritt weiter, in dem die einzusetzenden Gerüstträger nicht nur umströmt sondern gerichtet durchströmt werden [Jäger und Barthold, 2003] (Abb. 3.45B). Erste Kultivierungen wurden mit

3. Ergebnisse und Diskussion

osteogenen Rattenzellen durchgeführt, wobei die Geometrie des Reaktors, die Rührerdrehzahl, die interne Umwälzrate sowie die Begasungsrate optimiert wurden [Barthold, 2003]. Hierauf basierend wurden in der vorliegenden Arbeit viele Versuchsreihen zur Langzeitkultivierung osteogener Kaninchenzellen in diesem Perfusionsbioreaktorsystem durchgeführt. Der Zweck dieses Schrittes war es alle relevanten Prozessparameter auf die 3D-Kultur von Kaninchenzellen anzupassen und zu optimieren. Für alle Experimente wurden die folgenden Parameter ausgewählt: Begasungsrate: $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, interne Umwälzung (Perfusion): $200 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, Medien austauschrate: $7 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ($10 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$), pO_2 : 20% Luftsättigung. Als Matrix wurden zwei verschiedene Trägergerüste, Camceram (Abb. 3.46A) und Osteoscaf (Abb. 3.46B) getestet. Abb. 3.46 zeigt außerdem die Geometrie des Gerüsthalters für jedes Konstrukt.

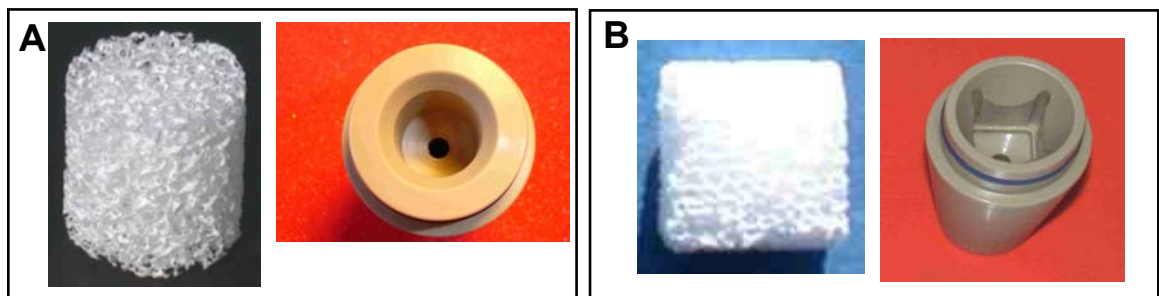


Abb. 3.46: Die Geometrie der verwendeten Osteoscaf- (A) und Camceram-Trägergerüste (B) sowie die der entsprechenden Gerüsthälter.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.4.2.1. Das Proliferationsverhalten von Kaninchenosteoprogenitoren auf Camceram

Ziel der Untersuchung war es die Proliferation von Kaninchenosteoprogenitoren auf Camceram-Trägern im Bioreaktor (Abb. 3.46B) zu überprüfen.

Die Trägergerüste wurden nach der Besiedlung (10^7 Zellen pro cm^3) für 10 Tage in 30 mL Proliferationsmedium im Bioreaktor bei kontinuierlichem Medienaustausch kultiviert. Als Kontrolle wurde parallel ein weiterer Gerüstträger im dynamischen 3D-Kultivierungssystem (Abb. 3.45A) kultiviert. Nach sieben Tagen Kultivierung wurde auf das Differenzierungsmedium (identisch dem Proliferationsmedium aber ohne die Cytokine FGF2, EGF und PDGF-BB) gewechselt. Während der Versuche wurden regelmäßig Proben aus dem Bioreaktor bzw. der Vergleichskultur entnommen und analysiert. Die Ergebnisse der zehntägigen Kultivierung sind im Folgenden dargestellt (s. Abb. 3.47; 3.48).

Ein Vergleich der Lactatkonzentrationsverläufe (Abb. 3.47A) zeigt deutlich, dass die Zellen in beiden Kultursystemen metabolisch zunehmend aktiv waren, was auf eine Proliferation der Zellen schließen lässt. Die Lactatkonzentration im Perfusionssystem nahm die ersten acht Tage über zu, danach erreichte sie ein Plateau. Dagegen ging die Lactatkonzentration im dynamischen System nach 9 Tagen zurück. Hierbei ist allerdings die Ausdünnung durch den kontinuierlichen Medienaustausch von etwa einem Drittel Reaktorvolumen pro Tag zu berücksichtigen. Die LDH-Werte im Überstand waren am ersten Tag im Bioreaktor sehr hoch. Dies könnte daran liegen, dass nach Einbringen des Camceram-Trägers in den Bioreaktor bis dahin nicht adhärierte Zellen durch die Perfusion ausgespült wurden und anschließend im Überstand abstarben. Danach sank die LDH-Aktivität ab und blieb durch den kontinuierlichen Medienwechsel auf einem stabilen, niedrigen Niveau. Berücksichtigt man wiederum die Ausdünnung der LDH-Aktivität durch den kontinuierlichen Medienaustausch, ergibt sich bedingt durch die anfänglich höhere Aktivität auch ein höherer Gesamtwert. Die Steigung der kumulativen LDH-Aktivität ist jedoch im Vergleich zum dynamischen 3D-Kultivierungssystem geringer, was auf ein im weiteren Verlauf der Kultivierung geringeres Absterben von Zellen hinweist.

3. Ergebnisse und Diskussion

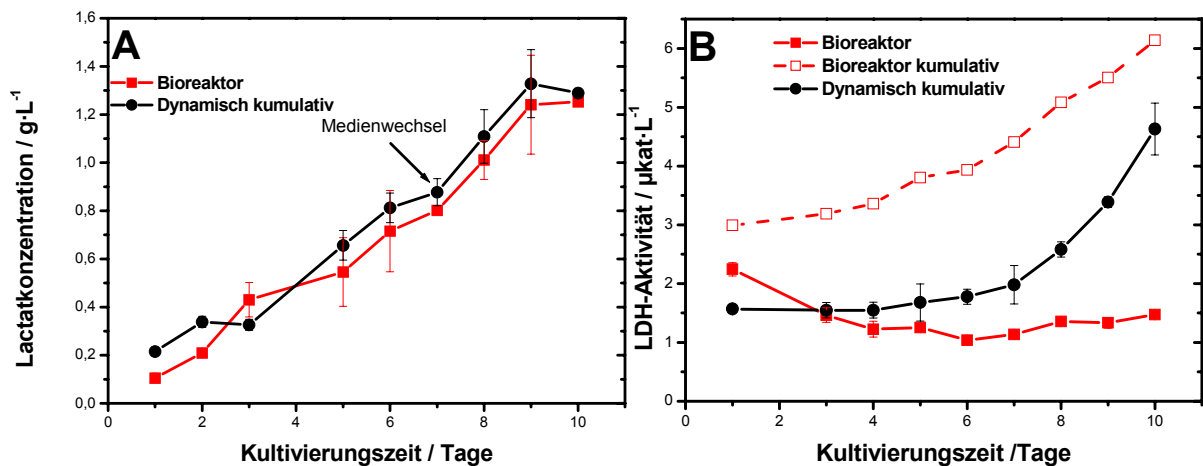


Abb. 3.47: Lactatkonzentrationen (A) und LDH-Aktivität (B) im Medienüberstand nach 10 Tagen Kultivierung von Kaninchenosteoblasten. Die Werte der Lactatkonzentrationen sowie der LDH-Aktivität im dynamischen System sind nach dem Medienwechsel kumulativ angegeben. Die Standardabweichungen berechnen sich aus jeweils drei parallel geführten Kulturen.

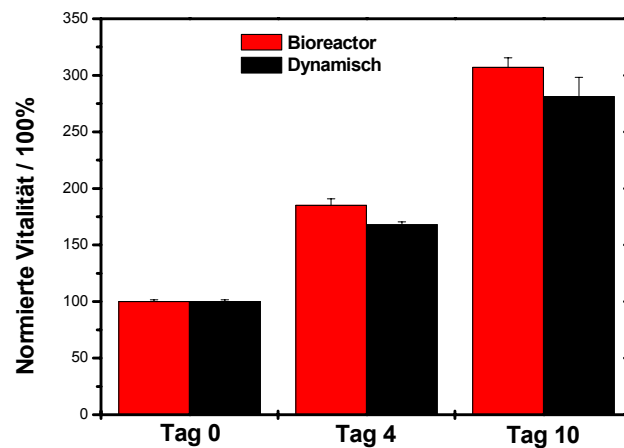


Abb. 3.48: Normalisierte Vitalitätsbestimmung mit WST-1 an den Tagen 0, 4 und 10 im Bioreaktor und dynamischer Kultur. Die Standardabweichungen berechnen sich aus jeweils drei parallel geführten Kulturen.

Hinsichtlich der mit Hilfe des WST-1-Tests ermittelten Vitalitäten der osteogenen Kaninchenzellen ergaben sich in den besiedelten Camceram-Trägern keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kultursystemen (dynamisch und Bioreaktor) (Abb. 3.48).

Insgesamt konnten nur vergleichsweise geringe Differenzen bei den gemessenen Kultivierungsparametern festgestellt werden, die dem Perfusionsbioreaktorsystem nur leichte Vorteile gegenüber dem dynamischen 3D-System einräumen. Letzteres ermöglicht zwar eine Konvektion des Kulturmediums mit den daraus resultierenden Scherkräften an der Camceram-Oberfläche [Sikavistas et al., 2002; Granet et al.,

3. Ergebnisse und Diskussion

1998], eine forcierte Durchdringung des Inneren des Camceram-Trägers mit Medium findet jedoch auch im dynamischen System nicht statt. Dies lässt die Hypothese zu, dass Zellen im Zentrum des Trägers auch weiterhin unzureichend mit Nährstoffen versorgt werden, wenngleich dieser Effekt im Vergleich zu einer statischen Kultur schon deutlich reduziert ist. Dies würde die deutlich höhere Steigerung der LDH-Aktivität im dynamischen Kultivierungssystem während des späteren Verlaufs der Kultivierung erklären.

3.4.2.2. Langzeitkultivierung osteogener Kaninchenzellen auf Camceram im Bioreaktor

Zur Untersuchung der Wachstums- und Differenzierungseigenschaften von Kaninchenosteoprogenitorzellen im Perfusionsbioreaktorsystem wurde jedes Camceram-Trägergerüst mit 10^7 Zellen pro cm^3 besiedelt. Während der Langzeitperfusionsversuche über insgesamt 30 Tage wurde zunächst Serum-reduziertes Proliferationsmedium über einen Zeitraum von sieben Tagen kontinuierlich ausgetauscht. Anschließend wurde nur noch Cytokin-freies Differenzierungsmedium verwendet. Prozessbegleitend wurden die Lactatkonzentration, LDH-Aktivität und die lösliche Alkalische Phosphatase im Überstand gemessen. Für weitere Untersuchungen wurde der Träger mittig in zwei Teile geschnitten. Eine Hälfte des Trägers diente der Bestimmung der Zellzahl mittels Hoechst Methode, die andere Hälfte wurde mittels Rasterelektronen-mikroskopie untersucht.

3. Ergebnisse und Diskussion

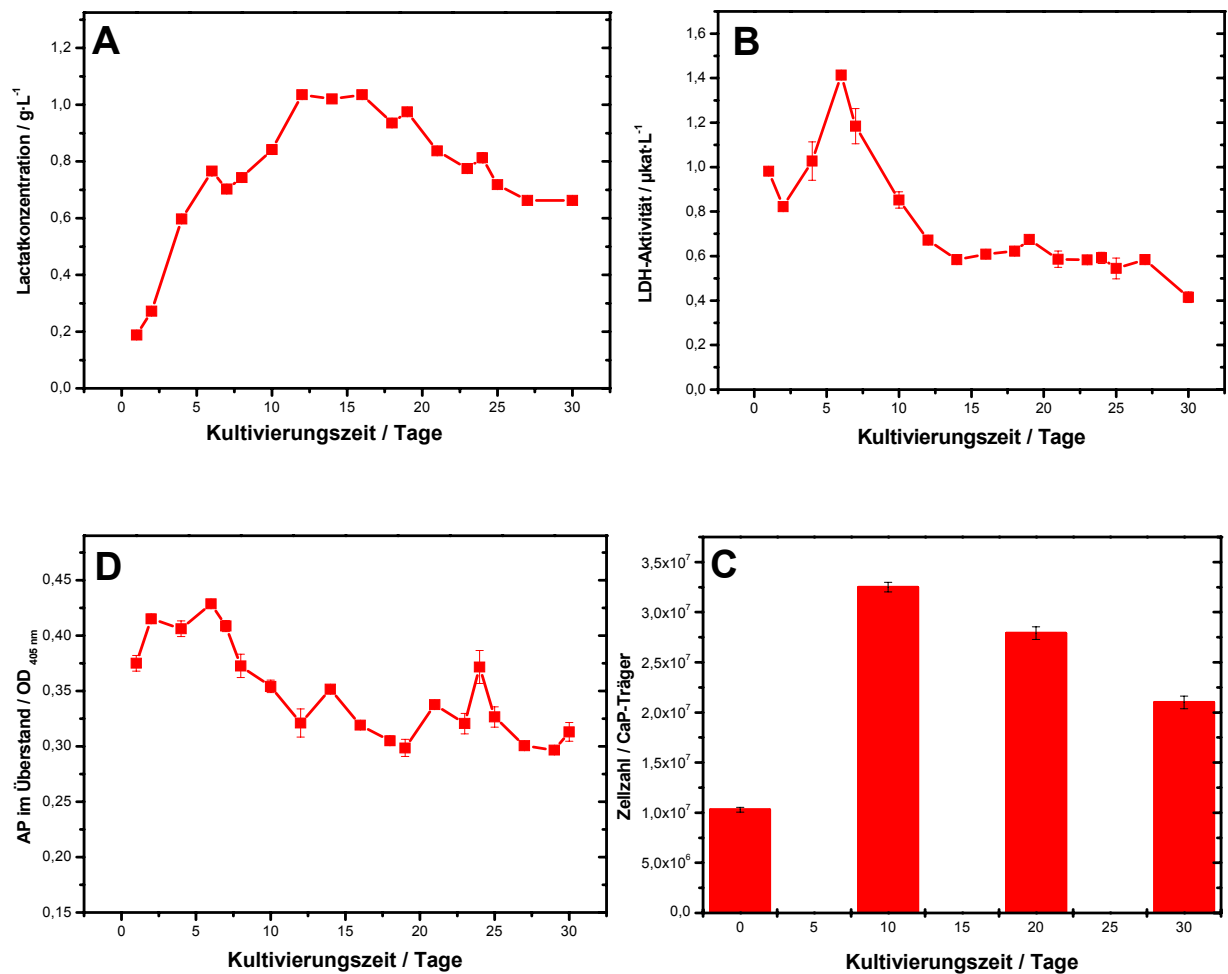


Abb. 3.49: Darstellung der Lactatkonzentrationen (A), LDH-Aktivität (B), Alkalischen Phosphatase im Überstand (D) und Bestimmung der Zellzahl im Trägergerüst durch DNA-Fluoreszenzfärbung mit Hoechst 33258 (C). Die Standardabweichungen berechnen sich aus jeweils drei parallel geführten Kulturen.

Dieses Experiment zeigte, dass die verwendeten Calciumphosphat-Trägergerüste sowohl Wachstum als auch Differenzierung der Zellen unterstützten. Während der ersten 12 Tage nahm die Lactatbildungsrate kontinuierlich zu, wie durch die ansteigenden Lactatkonzentrationen gezeigt wurde, und die maximale Zellzahl von $3,42 \cdot 10^7$ Zellen wurde nach zehn Tagen erreicht. Nach dem Weglassen der Cytokine aus dem Kulturmedium begann eine verstärkte Differenzierung der Zellen. Dies hatte im weiteren Verlauf auch einen Rückgang der Lactatkonzentrationen zur Folge (Abb. 3.49A) und korreliert auch mit der leicht rückläufigen Zellzahl in den Trägern (Abb. 3.49C). Die LDH-Aktivität am ersten Tag der Kultivierung war üblicherweise höher als an den Folgetagen (Abb. 3.49B). Dies ist auf nicht-adhärierte Zellen zurückzuführen, die mit dem Start der Perfusion aus dem Trägergerüst herausgespült wurden und in

3. Ergebnisse und Diskussion

den folgenden Tagen in der Suspension abstarben. Mit dem einsetzenden Zellwachstum und verstärkt während der sich anschließenden Differenzierungsphase nahm die LDH-Aktivität anschließend wieder ab.

Als Indikator für die osteogene Differenzierung wurde die lösliche Alkalische Phosphatase bestimmt. Sie stieg die ersten 7 Tage an und nahm danach wieder ab. Anschließend blieb sie im weiteren Verlauf der Kultur auf dem erreichten Plateau (Abb. 3.49D). Dieses deutete darauf hin, dass das entsprechende Differenzierungsstadium damit abgeschlossen war und es sich um reife Osteoblasten handelt, die anschließend dem programmierten Zelltod (Apoptose) unterliegen [Lynch et al., 1998], wodurch auch die Reduzierung der Zellzahl im Camceram-Träger erklärbar ist. In der Phase der Matrixreifung bildeten die Osteoblasten aus Kollagenfibrillen eine extrazelluläre Knochenmatrix, die später mineralisiert wurde (s. Abb. 3.51). Die damit einhergehende Akkumulation von Calciumphosphaten in die Matrix wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie ermittelt (s. 3.4.2.3).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit dem gewählten Perfusionssystem sowohl eine Proliferation als auch eine zielgerichtete Differenzierung der knochenbildenden Kaninchenzellen möglich war. Die Daten der prozessbegleitenden Analytik zeigten deutlich, dass die Zellen auf den Camceram-Trägergerüsten eine hohe Vitalität erreichten und differenzierten.

3.4.2.3. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von besiedelten Camceram Trägergerüsten

Um die Zellen nun innerhalb des Trägers nachweisen und identifizieren zu können, wurden die besiedelten Trägergerüste mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Trägergerüste waren sehr spröde und konnten nur durch einen Ausbruch im Querschnitt beurteilt werden. Dabei zeigte sich (Abb. 3.50A), dass die Zellen sich sowohl an der Oberfläche des Calciumphosphat-Gerüsts als auch in der Tiefe der Poren anhefteten und ausspreiteten, wobei sie eine aus Kollagenfibrillen bestehende Matrix ausbildeten (Abb. 3.50B). Später, nach 30 Tagen Kultivierung wurden kleine weiße Partikel (Hydroxylapatitkristalle) beobachtet (Abb. 3.51), die auf eine zunehmende Mineralisierung durch die Kaninchenosteoblasten schließen lassen.

3. Ergebnisse und Diskussion

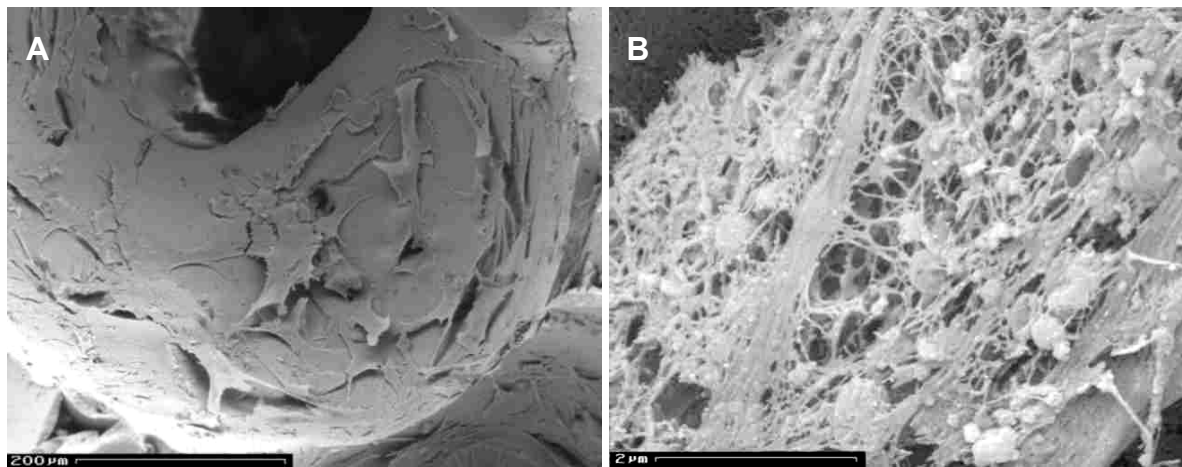


Abb. 3.50: KMSZs in Camceram Trägergerüsten nach 10 Tagen Perfusionskultur (A): Tiefenwachstum der Zellen in den interkonnektierenden Poren. (B): Bildung der mineralisierten Matrix.

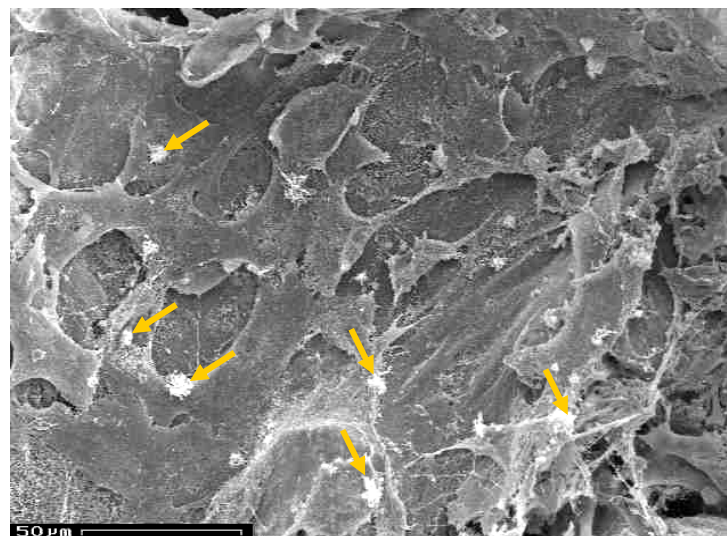


Abb. 3.51: Ausbildung von Hydroxylapatitkristallen (gelbe Pfeile) im Camceram Trägergerüst nach 30 Tagen Kultivierung im Bioreaktor.

Die vorgestellten Daten zeigen, dass die erzwungene Durchströmung des Trägers nicht nur zur Besiedlung und zum Wachstum von Zellen in tieferliegenden Poren des Trägers führte, sondern auch zur Produktion von Knochenmatrix auf den Oberflächen des 3D-Gerüsts. Damit erfüllt das Camceram Trägergerüst insbesondere aufgrund seiner Porosität die meisten Anforderungen an einen Zellträger für die Knochenregeneration.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.4.2.4. Langzeitkultivierung osteogener Kaninchenzellen auf Osteoscaf im Bioreaktor

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens und der Differenzierung im Bioreaktor wurden Osteoscaf-Träger (PLGA/CaP) mit 10^7 Zellen besiedelt und über einen Zeitraum von 30 Tagen kultiviert. Als Kontrolle wurden weitere Osteoscaf-Träger mit gleicher Beimpfungsdichte dynamisch im Inkubator kultiviert. Der Medienwechsel für die Referenzkulturen erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche. Die Zellen wurden in Serum-reduziertem Proliferationsmedium kultiviert. Nach 7 Tagen Kultivierung wurde nur noch Cytokin-freies Differenzierungsmedium (ohne PDGF-BB, FGF2, EGF) verwendet. Zur Beurteilung der metabolischen Aktivität sowie der Vitalität der Zellkulturen wurden die Lactatkonzentration sowie die LDH-Aktivität im Überstand bestimmt. Als Differenzierungsparameter wurde die lösliche Alkalische Phosphatase im Überstand gemessen. Für weitere Untersuchungen wurde der Träger mittig geschnitten: Eine Hälfte diente zur Zellzahlbestimmung mittels Hoechst-Methode, die andere Hälfte wurde für histologische Untersuchungen nach Paraffineinbettung vorbereitet. Die Ergebnisse der vergleichenden dynamischen Kultur sind in Abb. 3.52 dargestellt.

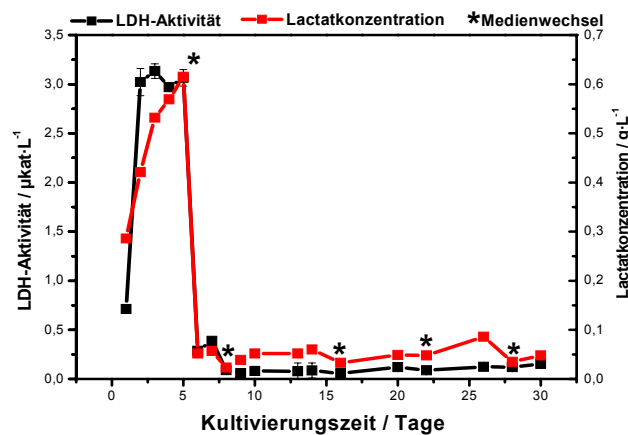


Abb.3.52: Bestimmung der Lactatkonzentration und der LDH-Aktivität osteogener Kaninchenzellen in dynamischer Kultur.

Die Daten zeigen, dass die Kultivierung nicht sehr erfolgreich verlief. Während der ersten fünf Tage bildeten die Zellen zunächst Lactat. Nach dem ersten Medienwechsel ging der Verlauf der Lactatbildung jedoch dramatisch zurück. Gleichzeitig erfolgte zunächst eine sehr hohe Zunahme der LDH-Aktivität. Bereits nach 48 Stunden wurde ein ungewöhnlich hoher Wert von $3,022 \mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ gemessen. Dies ist offensichtlich darauf zurückzuführen, dass viele Zellen sich vom Träger

3. Ergebnisse und Diskussion

ablösten und dabei abstarben. Nach dem Medienwechsel war kein deutliches Wachstum der Zellen mehr zu beobachten. Die LDH-Aktivität sowie die Lactatkonzentration verliefen fortan auf einem sehr niedrigen Niveau. Außerdem kann festgehalten werden, dass die Osteoscaf-Trägergerüste in dynamischer Kultur einer permanenten mechanischen Belastung durch die Rotation des 50-mL-Röhrchens ausgesetzt waren, die zu einer sukzessiven Degradation führte. Während der Kultivierung wurde eine leichte Schrumpfung des Trägers festgestellt (s. Abb. 53), die dazu führte, dass das zunächst fest zwischen den siebartigen Gittern eingespannte Material wieder frei flotieren konnte. Im Folgenden konnte durch die ständige Reibung am Gitter Abrieb in Form kleiner Partikel im Überstand beobachtet werden.

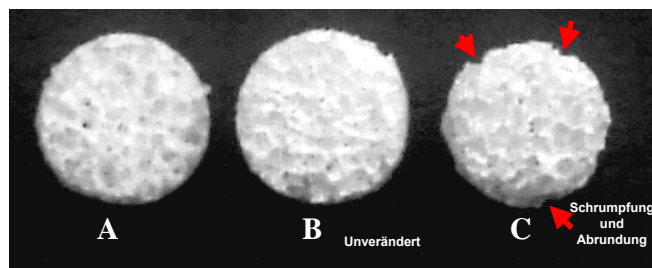


Abb. 3.53: Darstellung der Trägergerüsten (Osteoscaf) nach 10 Tagen Kultivierung osteogener Kaninchenzellen im Bioreaktor (**B**) oder im dynamischen 3D-Kultivierungssystem (**C**). (**A**): unbesiedelter Osteoscaf. Bei dynamischer Kultivierung wurde eine leichte Schrumpfung des Trägers nach 10 Tagen Kultivierung festgestellt. Dagegen blieb die dreidimensionale Gerüststruktur des Osteoscafs im Perfusionssystem unverändert.

Bei den parallel im Bioreaktor durchgeführten Kultivierungen wurde wie in Abb. 3.54A ersichtlich anhand der kontinuierlichen Lactatbildung nachgewiesen, dass die Zellen wuchsen. Die Lactatkonzentration stieg schnell über die ersten 7 Tage der Kultivierung an um danach nur sehr langsam abzusinken. Gleichzeitig stieg die LDH-Aktivität (Abb. 3.54B) mit dem Wachstum der Zellen am Anfang der Kultur einhergehend an, erreichte nach 10 Tagen ihr Maximum und fiel anschließend wieder deutlich ab. Nach 10, 20 und 30 Tagen wurde die Zellzahl mittels DNA-Fluoreszenzfärbung (Hoechst) bestimmt. Demzufolge war die Zellproliferation nach 10 Tagen weitestgehend abgeschlossen (Abb. 3.54C).

Als Parameter für die Phase der Matrixreifung wurde die Aktivität des löslichen Enzyms Alkalische Phosphatase, das als früher Marker von Osteoblasten angesehen wird, bestimmt (Abb. 3.54D). Sie stieg die ersten 13 Tage an und sank danach wieder ab. Hierbei wurde beobachtet, dass die Differenzierung der Zellen auf dem

3. Ergebnisse und Diskussion

Osteoscaf-Träger im Vergleich zu 2D-Kulturen schneller begann. In 2D-Kulturen gelang ein Nachweis der AP erst nach dem Weglassen der Cytokine (s. Kap. 3.2.3.2). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass 2D-Kultursysteme nicht die für Knochenzellkulturen typische räumliche Anordnung aufweisen. Zusätzlich ist durch mehrere Autoren dokumentiert, dass die Medienperfusion in 3D-Knochenzellkulturen die Osteoblastendifferenzierung induziert. So nehmen die Expression von Markern des osteoblastären Phänotyps und die Ablagerung von mineralisierter extrazellulärer Matrix im Vergleich zur konventionellen 2D-Kultur in 3D-Perfusionskulturen zu [Holtorf et al., 2005; Meinel et al., 2004].

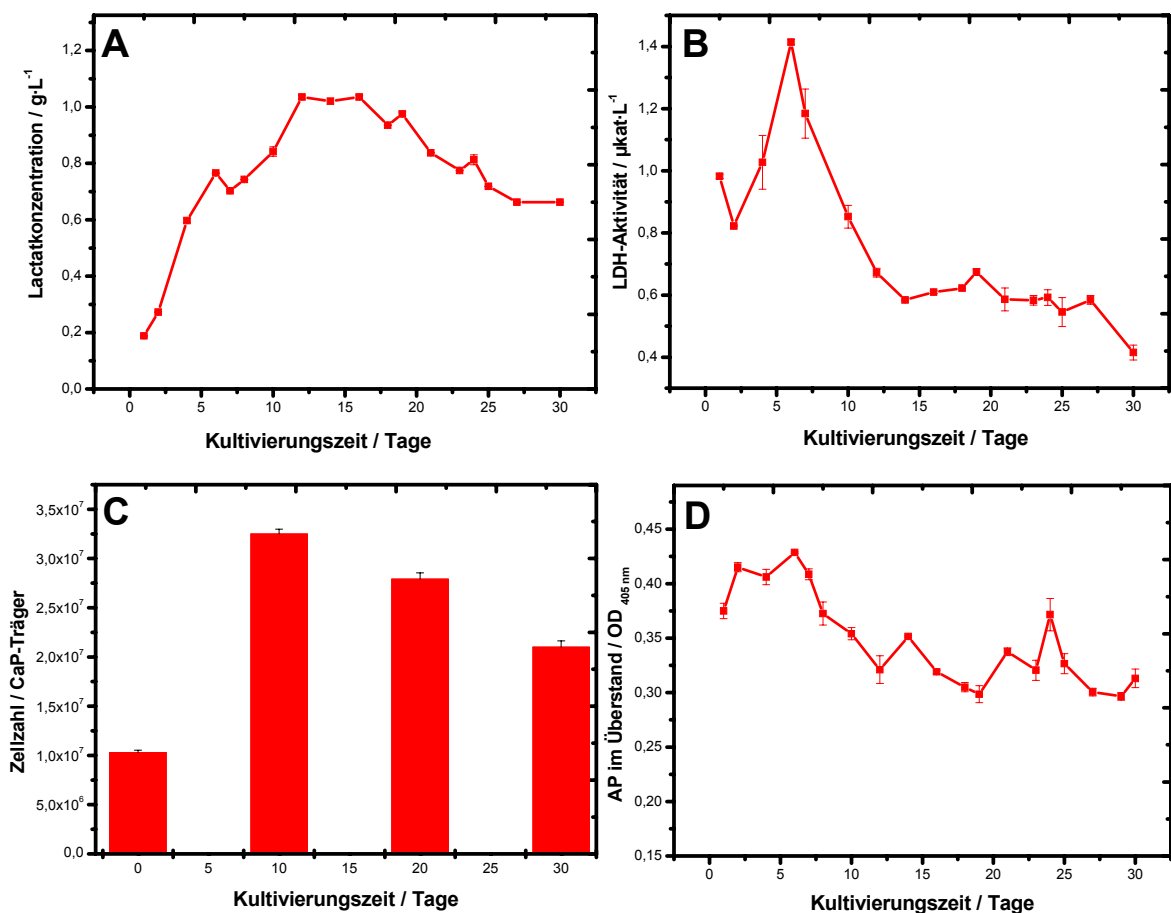


Abb.3.54: Langzeitkultivierung osteogener Kaninchenzellen über 30 Tage auf Osteoscaf-Trägergerüsten im Bioreaktor. Darstellung der Lactatkonzentration (A), der LDH-Aktivität (B), der löslichen AP im Überstand (D) und der Zellzahl mittels Hoechst 33258 Färbung (C). Die Standardabweichungen berechnen sich aus jeweils drei parallel geführten Kulturen.

Des Weiteren gelang es die im Vergleich zu Camceram weichen Osteoscaf-Träger zur Vorbereitung histologischer Untersuchungen nach einem selbst optimiertem Protokoll in 5 µm dicke Scheiben zu schneiden. Um die Zellen und die Bildung der Extrazellulären Matrix visualisieren zu können wurden lichtmikroskopische

3. Ergebnisse und Diskussion

Aufnahmen von KMSZs auf dem Osteoscaf gemacht (Abb. 3.55). Hierfür wurden 5 μm dicke Schnitte aus dem Zentrum des Trägers entnommen und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Wie in Abb. 3.55 zu sehen ist, war durch die Perfusion und die interkonnektierenden Poren der Osteoscaf-Träger ein Einwandern von Zellen auch in ganz tief liegende Poren des Materials möglich. Die Zellen konnten dort normal proliferieren und Matrix bzw. das Osteoid (rosa Farbe, Abb. 3.55) produzieren.

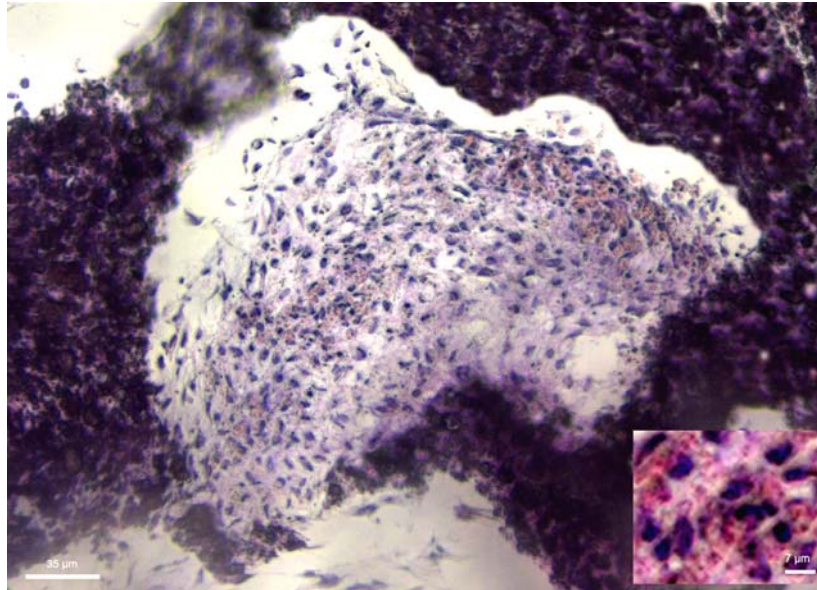


Abb. 3.55: Lichtmikroskopische Aufnahme eines 5 μm Schnittes besiedelter Osteoscaf-Trägergerüste) nach 10 Tagen Kultivierung im Bioreaktor. Die Färbung wurde mit Hämatoxylin-Eosin durchgeführt.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass das dynamische Kultivierungssystem in der hier gewählten Form aufgrund der leichten Schrumpfung des Trägergerüsts und der darauf folgenden, schnellen Degradation von PLGA/CaP nicht geeignet ist. Dagegen gelang es die 3D-Kultivierung der osteogenen Kaninchenzellen auf Osteoscaf im Bioreaktor durchzuführen. Das Perfusionssystem hat somit neben der Durchströmung des Mediums den zusätzlichen Vorteil die dreidimensionale Gerüststruktur in der Langzeitkultur deutlich besser zu erhalten. So konnte eine 3D-Kultivierung auf Osteoscaf im Bioreaktor über einen Zeitraum von 30 Tagen erfolgreich durchgeführt werden.

3.4.2.5. Histologische Untersuchungen von Zellen auf Osteoscaf in statischer Kultur und im Bioreaktor

Zur weiteren histologischen Untersuchungen der Zellverteilung auf Osteoscaf Gerüsträgern wurden zusätzlich zum oben beschriebenen Experiment (Kapitel 3.4.2.4) weitere Vergleichskulturen unter statischen Bedingungen durchgeführt. Nach 10 Tagen wurden die besiedelten Trägergerüste fixiert, gewaschen und für die Paraffineinbettung vorbereitet. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Abb. 3.56B zeigt die Verteilung der Zellen auf Osteoscaf-Trägern in statischer Kultur. Dabei wurde das Wachstum der Zellen in den Poren des Trägers mittels Lichtmikroskopie beobachtet. Das Zellnetz zeigte keine dichte dreidimensionale Struktur. Im Bioreaktor wuchsen die Zellen hingegen in einem dichten Netz über die gesamte Oberfläche der Osteoscaf-Träger wie in Abb. 3.56A zu sehen ist. Nach 10 Tagen Kultivierung hatten die Zellen eine dichte Matrix produziert, die durch Eosin rosa gefärbt ist (Abb. 3.56A).

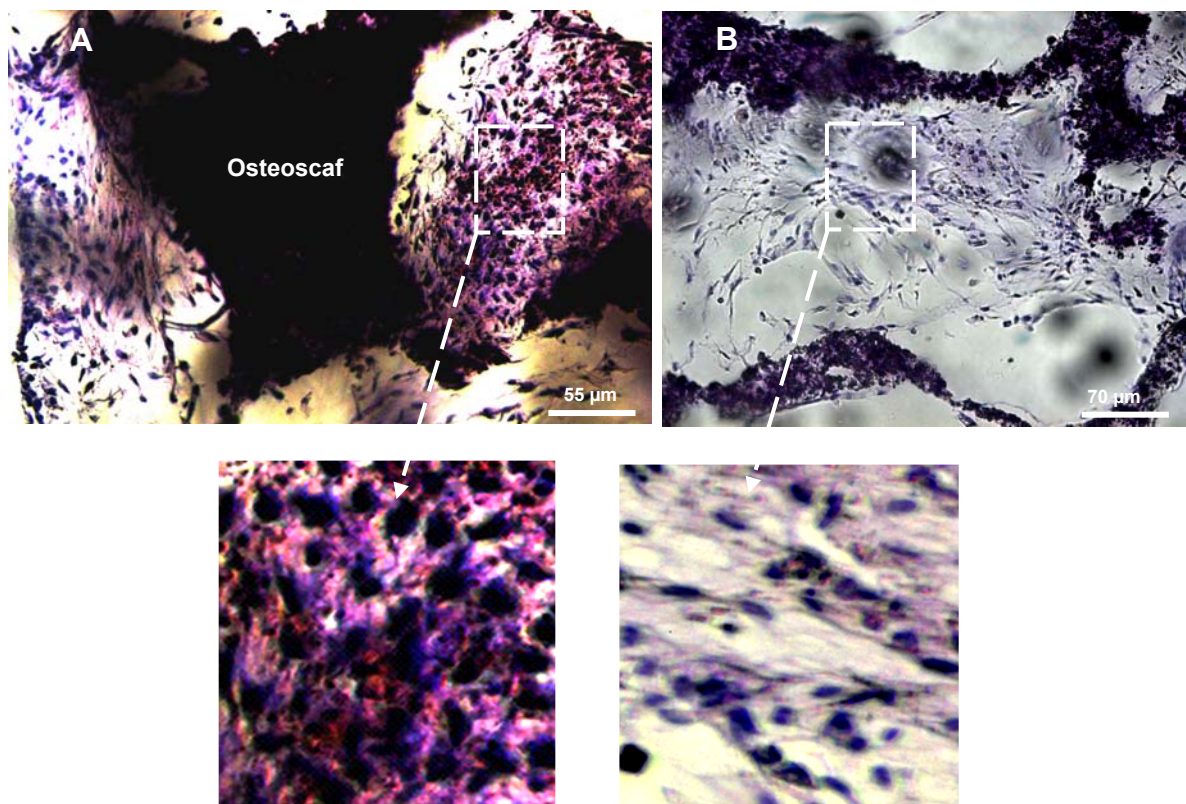


Abb. 3.56: Vergleich der Verteilung der Zellen nach 10 Tagen im Bioreaktor (A) und in statischer Kultur (B). Hierfür wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

3. Ergebnisse und Diskussion

In Perfusionskultur mit kontinuierlichem Medienwechsel kam es zu einem stetigen Wachstum der Zellen und Matrix-Bildung innerhalb des gesamten zugänglichen Volumens des 3D-Trägers, wobei dunkelblau gefärbte osteoblastäre Zellen zu sehen waren. In statischer Kultur hingegen konnten trotz des Medienwechsels diese oder ähnliche Ergebnisse nicht gezeigt werden (Abb.3.56B). Die sehr schwache Bildung der ECM in statischer Kultur ist mit einer ungenügenden Strömung des Nährmediums innerhalb des Trägers verbunden. Dabei akkumulieren offensichtlich schädliche Stoffwechselmetabolite, was zu einer schlechteren Matrixbildung führte. Durch die Perfusion mit der damit einhergehenden besseren Nährstoffversorgung zeigten die Zellen in den histologischen Färbungen eine osteoblastenähnliche Morphologie. Zellen, die in statischer Kultur kultiviert wurden, hatten eine gestrecktere Form (Abb.3.56B) als diejenigen im Bioreaktor (flächigerer Phänotyp; s. Abb. 3.56A).

Ein direkter Vergleich dieser Daten mit Literaturwerten ist aufgrund der unterschiedlichen Kulturmodelle, -systeme und -bedingungen schwer durchführbar. Die Ergebnisse stehen aber im Einklang mit der Beobachtung, dass die Perfusion deutliche Vorteile gegenüber der statischen Kulturen bei der 3D-Matrixbildung hat [Goldstein et al., 2001; Mueller et al., 1999]. Das im Vergleich zu Camceram wesentlich elastischere Osteoscaf-Trägermaterial stellte sich als gut geeigneter Träger für Wachstum und osteogene Differenzierung von KMSZs *in vitro* heraus.

4. Allgemeine Diskussion

Die Herstellung von Knochengewebe mittels *Tissue Engineering* ist ein vielversprechendes Forschungsgebiet, um Knochendefekte aufgrund von Trauma, Infektion, Krankheiten wie Osteoporose sowie aufgrund von Missbildungen zu beheben. Trotz intensiver Untersuchungen zur Knochengewebezüchtung konnten bis heute keine völlig zufriedenstellenden Resultate erzielt werden, da die Knochenbildung durch zahlreiche Parameter wie osteogene Faktoren, Zellquelle, Cytokinen, Besiedlungsdichte, Trägermaterialien und Kultursysteme beeinflusst wird. Diese Arbeit im Rahmen des EU-Projekts *Tissue Reactor* fokussierte darauf die oben genannten Faktoren gezielt zu optimieren, um das Implantat *in vitro* mit guter Qualität herzustellen. Im Zuge der einzelnen Schritte zur Herstellung des Implantats, dessen endgültige Evaluierung bei einem Kooperationspartner *in vivo* im Defektmodell erfolgt (s. Abb. 4.57, rote Pfeile), gelang es die entwickelte Strategie stufenweise entsprechend folgendem Schema umzusetzen (s. Abb. 4.57, grüne Pfeile).

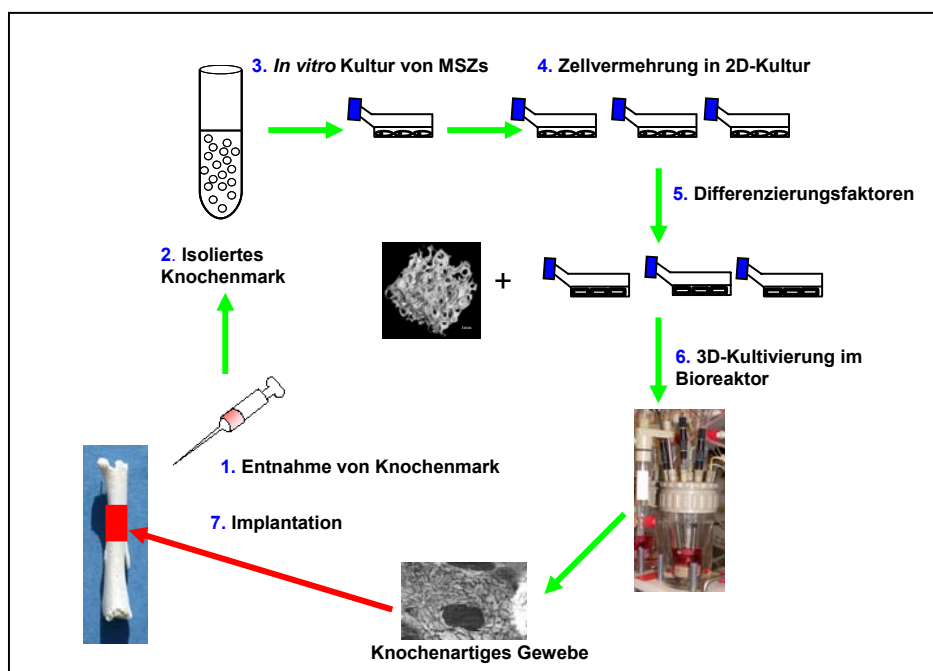


Abb.4.57: Das Konzept des in dieser Arbeit verfolgten Knochen-*Tissue-Engineering*. Das Knochenmark wird vom Kaninchen entnommen (1,2). KMSZs werden *in vitro* selektiert, vermehrt und unter dem Einfluss von osteogenen Faktoren differenziert (3, 4, 5). Das Trägergerüst wird mit *in vitro* vermehrten Zellen besiedelt (6). Anschließend erfolgt die Implantation an die Stelle des Knochendefektes (7).

4.1. Etablierung des Kaninchenmodells

Zur Heilung von Knochendefekten *in vivo* wurden verschiedene Tiere, unter anderem Kaninchen, Mäuse, Ratten, Schweine, Hunde und Affen verwendet, wobei Kaninchen und Ratten die am häufigsten untersuchten Tiere darstellen [Holy et al., 2000b]. Die für das *Tissue-Reactor*-Projekt geplante *In-vivo*-Studie wurde am Kaninchenmodell durchgeführt, da sich in diesem Tier Knochendefekte einer Größe von 1 cm³ herstellen lassen. Diese sind damit kompatibel zu den zur Verfügung stehenden neuartigen Trägergerüstmaterialien und erlauben eine anschließende Implantation des Materials. Die Ratte ist hingegen trotz Vorteilen in Haltung und Kosten für entsprechende Implantationsexperimente ungeeignet, da sie über keine ausreichend großen Knochen verfügt. Zusätzlich verlaufen Heilung und Regeneration des Knochendefektes bei der Ratte meist schneller als beim Menschen [Hollinger et al., 1990]. Dagegen zeigen Kaninchen ein dem Menschen recht ähnliches Knochenwachstum [Holy et al., 2000b] und wurden daher oftmals zur Untersuchung der Knochenheilung herangezogen [Notoya et al., 1999; Breitbart et al., 1998]. Kaninchen gelten somit auch als valides Modell für eine spätere Humananwendung.

Die Vermehrung von mesenchymalen Stammzellen in einem Medium, dem fötales Kälberserum zugesetzt wird, ist heute eine etablierte Methode, um Zellen für das *Tissue Engineering* zu gewinnen. In der Literatur wurden Knochenvorläuferzellen routinemäßig in verschiedenen Kulturmodellen mit einem Standardmedium, supplementiert mit 10% oder 20% FBS gezüchtet [Haynesworth et al., 1992; Lennon et al., 1996; Oreffo et al., 1997]. Für diese Arbeit wurden Kulturbedingungen entwickelt, die in einer verbesserten Ausbeute an Knochenvorläuferzellen resultierten. So zeigte sich in den eigenen Untersuchungen speziell durch den Zusatz osteogener Faktoren (L-Ascorbat-2-Phosphat, β -Glycerophosphat, Dexamethason) in serumhaltigem Medium eine deutliche Erhöhung der Proliferation von Kaninchenzellen und bestätigten die in verschiedenen *In-vitro*-Kulturmodellen mit Zellen der Ratte oder des Menschen nachgewiesenen Literaturdaten [Peter et al., 1998; Coelho und Fernandes, 2000]. Somit wird belegt, dass die osteogenen Faktoren sowohl für die Differenzierung als auch die Proliferation als Stimuli agieren. Des Weiteren konnte mit dem entwickelten Kulturmedium eine im Vergleich zu Literaturdaten schnellere Proliferation erzielt werden. So war die sog. CFU-F Bildung

4. Allgemeine Diskussion

(*Colony forming units-fibroblasts*) bereits sechs Tage nach der Isolierung unter dem Mikroskop zu erkennen. Anselme et al., die aus Kaninchenknochenmark isolierte Zellen in MEM, supplementiert mit 15% FBS und 10^{-8} M Dexamethason kultiviert haben, beobachteten die ersten CFU-F hingegen selbst unter optimalen Bedingungen erst 10 Tage nach der Isolierung [Anselme et al., 1999]. Diese Daten zeigen, dass die hier gewählten Kulturbedingungen für die Expandierung der osteogenen Kaninchenzellen wesentlich besser geeignet sind. Das entwickelte Kultivierungsverfahren für die Proliferation dieser Zellen ist somit vielversprechend für den Einsatz im Knochen *Tissue Engineering*.

Die Osteogenese ist ein komplexer Prozess, der drei Phasen (Proliferation, Matrixbildung und Mineralisierung) beinhaltet [Owen et al., 1990; Aubin, 2000]. Es gelang in dieser Arbeit diesen Differenzierungs- und Mineralisierungsablauf auch für Kaninchenzellen nachzuweisen. Die gewonnenen Daten korrelieren gut mit dem von Owen et al. entwickelten Modell der dreiphasigen Entwicklung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten [Owen et al., 1990]. Des Weiteren gelang es den im Rattenmodell gefundenen Differenzierungsablauf [Barthold, 2003] mit Kaninchenzellen bis auf einige kleinere Abweichungen wie z.B. einer beschleunigten ECM-Mineralisierung zu reproduzieren. Diese Abweichungen könnten durch die Speziesunterschiede bedingt sein.

Es ist außerdem zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit eine gerichtete Differenzierung und anschließende starke Mineralisierung der knochenbildenden Zellen ohne Zusatz von anderen, die Differenzierung stimulierenden Faktoren wie z.B. TGF- β und BMPs gelang [Machwate et al., 1995; Sun et al., 2003].

4.2. Induktion der Adipogenese unter Zusatz von Kaninchenserum

Mesenchymale Stammzellen sind multipotent und können sich zu Fibroblasten, Myoblasten, Adipocyten und Chondrocyten entwickeln [Owen, 1985; Pittenger et al., 1999].

Mehrere Studien berichten über die Transdifferenzierung von Osteoblasten zu Adipocyten *in vitro* und weisen darauf hin, dass diese Transdifferenzierung durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann [Park et al. 1999; Thomas et al., 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass osteogene

4. Allgemeine Diskussion

Kaninchenzellen unter Einfluss eines Kaninchenserum-haltigen Mediums zu Adipocyten differenzieren können (s. Kap. 3.2.1).

Von Diascro et al. konnte für die humanen Zelllinien Saos-2/B10 und MG-63 nachgewiesen werden, dass Kaninchenserum die Differenzierung in Richtung Adipocyten fördern kann [Diascro et al., 1998]. Ihre Daten zeigten nach Stimulation mit 5% KS einen Anstieg der mRNA von PPAR γ , der zur PPAR-Familie (*peroxisome proliferator activated receptor*) gehört und für die Adipocytendifferenzierung erforderlich ist [Tontonoz et al., 1994]. Zudem wurde nachgewiesen, dass KS seine Wirkung auf PPARs über Fettsäuren, die in KS enthalten sind, vermittelt wird. Eigene Untersuchungen zeigten, dass sich diese die Adipocytendifferenzierung fördernden, lipidartigen Substanzen mit Hilfe einer einfachen Dichtegradientenultrazentrifugation nicht abtrennen lassen, da sie offenbar an Albumin oder Lipoproteine gebunden sind. Hierfür wäre eine weitere Erhöhung der Dichte mit Hilfe konzentrierter Salze (z.B. KBr) notwendig [Jonas, 1972].

Demnach vermag das Kaninchenserum die AP-Aktivität der Zellen zu unterdrücken und die Adipocytendifferenzierung zu begünstigen, wobei ungeklärt blieb, ob die Adipocyten *in vitro* ausschließlich aus den mesenchymalen Stammzellen ausdifferenzieren oder ob auch bereits ausdifferenzierte Osteoblasten zu Adipocyten transdifferenzieren können.

4.3. Entwicklung eines geeigneten Serum-reduzierten Mediums

Der Einsatz eines Serum-reduzierten oder sogar serumfreien Mediums ist für die klinische Anwendung *in vitro* generierter, hochvitaler Knochenimplantate von großer Wichtigkeit, da es nicht bei jedem Patienten immer möglich ist, für die *In-vitro*-Kultur ausreichende Mengen autologen Serums zu gewinnen.

Im Zuge der Entwicklung eines geeigneten Serum-reduzierten Kulturmediums war der Einsatz von Wachstumsfaktoren (IGF, FGF2, EGF, PDGF-BB) sehr wichtig. Die biologischen Effekte dieser Faktoren auf die Proliferation und die Differenzierung von Osteoblasten sind umfassend in der Literatur beschrieben [Zhang et al., 1991; Rodan et al., 1989; Kim und Valentini, 1997], wobei es nur wenige Arbeitsgruppen gibt, die sich mit einem Ersatz des Serums durch diese Cytokine beschäftigen [Angele et al., 1999; Reyes et al., 2001]. Reyes et al. demonstrierten, dass Zellen, gewonnen aus humanem Knochenmark und kultiviert in einem mit 2% FBS, ITA, sowie jeweils 10

4. Allgemeine Diskussion

ng·mL⁻¹ PDGF-BB und EGF angereicherten Medium, bis zu 53 Zellverdopplungen erreichten [Reyes et al., 2001]. Über das osteoblastäre Differenzierungspotential dieser Zellen wurde allerdings nicht berichtet. In den durchgeführten Versuchen zeigten die osteogenen Kaninchenzellen bei einer Cytokinkombination von PDGF-BB, EGF und FGF2 die höchste Proliferationsrate. Die Zelldichte erreichte dabei ca. 200% der Kontrolle (ZKT-I + 15% FBS + OS). Serum konnte jedoch aufgrund der darin enthaltenen, essentiellen Adhäsionsproteine lediglich von 10% auf 1% reduziert werden.

Cytokine wirken sowohl stimulierend auf die Proliferation osteogener Zellen [Yang et al., 2000, Robinson et al., 1995] als auch inhibierend auf ihre Differenzierung [Hurley et al., 1994]. So beweisen mehrere *in vitro*-Versuche, dass z.B. EGF die Proliferation osteogener Zellen fördert, ihre Differenzierung jedoch unterdrückt, wobei die Differenzierung der Zellen in Anwesenheit der Cytokinen auch von deren Inkubationszeit abhängig ist [Yoneda, 1996]. So erhöhte z.B. eine kurzzeitige (4-48 h) Zugabe von EGF zur *In-vitro*-Kultur von Rattencalvarienzellen die Anzahl der Nodules, während ein Zusatz über 4 Kultivierungstage deren Zahl verringerte [Yoneda, 1996]. In diesem Zusammenhang wurde auch in dieser Arbeit erst nach dem Weglassen der Cytokine nach 7 Tagen Kultivierung eine Differenzierung der osteogenen Kaninchenzellen gefunden. Unterstützt werden die hier vorgestellten Erkenntnisse auch durch analoge Versuche von Barthold mit Rattenzellen [Barthold, 2003].

4.4. 3D-Kultivierung

4.4.1. Diskussion der Besiedlungsdichte und der Träger für die 3D-Zellkultur

Damit durch *Tissue Engineering* aus proliferierenden Zellen funktionelles Knochengewebe entsteht, müssen diese in einer dreidimensionalen Matrix angesiedelt werden [Minuth et al., 2003]. Die Auswahl der richtigen Besiedlungsdichte ist dabei ein wichtiger Faktor. Sowohl in dieser Arbeit als auch von Barthold konnte eine Ausgangszelldichte von 10^7 Zellen pro cm^3 Trägergerüst als optimal ermittelt werden [Barthold, 2003]. Dabei stellte sich aber heraus, dass eine Besiedlungsdichte von 10^7 zu einer schnelleren Differenzierung und damit zu einer verkürzten Kultivierungszeit führte. Andere Autoren hingegen haben für 3D-Kulturen eine initiale Dichte von lediglich 10^6 Zellen pro cm^3 verwendet [Holy et al., 2000a, Ishaug-Riley et al., 1997b]. Diese vermeintlich widersprüchlichen Daten wurden jedoch durch die Studien von Holy et al. über den Einfluss der Ausgangszelldichte für die 3D-Kultivierung von Wistar Rattenzellen auf die Mineralisierung in PLGA-Trägern eindeutig geklärt. Ihre Resultate zeigten, dass sowohl eine niedrige als auch eine hohe Ausgangszelldichte, besonders in Langzeitkulturen über sechs Wochen, letztendlich zu gleichen Ergebnissen bezüglich der Mineralisierung des Trägers führen. Daher ist davon auszugehen, dass die Höhe der initialen Ausgangszelldichte zwar den Umfang der 3D-Matrix-Bildung nicht signifikant beeinflusst, für den zeitlichen Verlauf der Differenzierung und anschließenden Mineralisierung jedoch von entscheidender Bedeutung ist [Holy et al., 2000a].

Des Weiteren ist die Auswahl geeigneter Trägergerüste ein besonders wichtiges Kriterium bei der Generierung eines funktionsfähigen Implantats. Für die vorliegende Arbeit standen zwei 3D-Kompositmaterialien zur Verfügung: Camceram (β -TCP/HA) und Osteoscaf (PLGA/CaP).

Bei den verwendeten Camceram-Gerüsten handelte es sich um eine Mischung aus Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat, die der mineralisierten Knochensubstanz sehr ähnlich sind. Daher zeigte der Camceram-Träger besonders gute Biokompatibilität und Osteokonduktivität und begünstigte die Anheftung, die Proliferation sowie die Differenzierung osteogener Kaninchenzellen. Auch andere *in vivo* und *in vitro* Versuche ergaben, dass diese oder ähnliche Träger aus

4. Allgemeine Diskussion

Calciumphosphat die Osteogenese begünstigen [Anselme et al., 1999, Barthold, 2003].

Weitere Vorteile des Camcerams bestehen darin, dass es hitzesterilisierbar ist und auch bezüglich der Bioresorbierbarkeit besser geeignet ist als ein reines Polymer wie z.B. Osteofoam (PLGA). Resorbierbare Knochenersatzmaterialien aus synthetischen Polymeren autodegradieren *in vivo* hydrolytisch, wobei oft saure Abbauprodukte freigesetzt werden (Milchsäure, Glycolsäure) und durch die Generierung eines unphysiologischen Mikro-Milieus den Knochenaufbauprozess beeinträchtigen.

Die mechanische Stabilität der natürlichen anorganischen Materialien ist meistens problematisch. Zwar weisen die keramischen Gerüste wie Camceram eine gute Formstabilität auf; sie sind jedoch sehr spröde und brechen leicht. Daher ist ihre Einsetzbarkeit *in vivo* stark eingeschränkt [Wang, 2003]. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten daher Komposite aus HA und/oder β -TCP und Polymeren hinsichtlich eines Einsatzes als Knochenersatz um die osteokonduktiven Eigenschaften der Keramik mit den guten mechanischen Eigenschaften der Polymere (Elastizität) zu verbinden [Kim et al., 2006; Peter et al., 2000; Piattelli et al., 1997].

Außerdem spielt die Porosität des Trägers eine wichtige Rolle für die Knochenregenerierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Sie erlaubt die Migration und Proliferation von Osteoblasten sowie die Matrixbildung in den freien Hohlräumen des Trägers. Die Makroporosität beider eingesetzter Trägergerüste führte zu einem deutlich verbesserten Einwachsen von Knochengewebe. Die Interkonnektivität der Poren im Trägergerüst ist dabei eine notwendige Grundvoraussetzung [Davies, 1999], speziell um auch eine nachfolgende Vaskularisierung des Gewebes zu erleichtern. *In vitro* garantiert die Interkonnektivität der Poren die gerichtete Durchströmung und somit die Funktionalität des eingesetzten Perfusionssystems.

4.4.2. Diskussion des Perfusionssystems

Ziel war die Herstellung hochvitaler, funktionaler Konstrukte aus osteogenen Kaninchenzellen und Matrix unter optimalen Bedingungen. Dafür wurde in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik (ZKT) der GBF ein Perfusionssystem entwickelt, welches die Nachteile statischer Kulturmethode eliminieren sollte [Jäger und Barthold, 2003]. In statischen Kulturen akkumulieren schädliche Stoffwechsel-

4. Allgemeine Diskussion

metabolite, die nicht kontinuierlich entfernt werden können. Nährstoffaustausch und Sauerstoffversorgung innerhalb des Trägers finden nur durch Diffusion statt, was für eine Langzeitkultivierung bei hohen Zelldichten nicht ausreichend ist [Mueller et al., 1999]. Spinnerflaschen, Rollerflaschen und auch das hier eingesetzte dynamische 3D-Kultivierungssystem sind keine Perfusionssysteme [Minuth et al., 2003], da es ihnen trotz der Reduzierung der lokalen Akkumulation von Stoffwechselmetaboliten durch Rühren oder Rotation an der Möglichkeit mangelt einen Austausch des Kulturmediums in der Tiefe des Trägermaterials vorzunehmen. Erst durch die Perfusion wurde ein effizienter Nährstofftransport in tiefere Schichten des Trägers erreicht, welcher über eine bloße Diffusion hinausgeht. In Kombination mit dem kontinuierlichen Medienwechsel durchströmte den Träger immer vergleichsweise frisches Medium und alle den Zellstoffwechsel potenziell schädigenden Substanzen wurden durch Erhöhung der Konvektionsrate entfernt (wie z.B. Lactat). Deswegen ist die Perfusionskultur bei der *in vitro* Kultur von Knochenvorläuferzellen anderen Systemen deutlich überlegen.

Es hat sich gezeigt, dass mit dem in der ZKT entwickelten Perfusionssystem eine Langzeitkultivierung osteogener Kaninchenzellen über einen Zeitraum von 30 Tagen möglich ist. Wie die Ergebnisse aus Kap. 3.4.2.2 und 3.4.2.4 beweisen, kam es durch die Perfusion zu einer starken Proliferation der Zellen innerhalb des gesamten Camceram- oder Osteoscaf-Trägers. Vergleicht man die Proliferation in statischer 10-Tage-Kultur auf beiden Trägergerüsten (Camceram und Osteoscaf) (s. Abb. 3.43C) mit der im Bioreaktor (s. Abb. 3.49C/3.54C) direkt miteinander, so zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Kultursystemen (s. Abb. 4.58). Dabei ist die Zellzahl pro Camceram- bzw. Osteoscaf-Trägergerüst im Bioreaktor um den Faktor 1,728 bzw. 1,783 höher als in statischer Kultur. Diese Daten der statischen und der Perfusionskultur stimmen somit gut mit den von Barthold ermittelten Ergebnissen über das Proliferationsverhalten von osteogenen Rattenzellen in Bioreaktor überein [Barthold, 2003]. Weiterhin kann spekuliert werden, dass die mechanische Stimulation der Zellen durch die bei der Nährmedienperfusion auftretenden Strömungskräfte im Perfusionssystem die Osteogenese der Zellen begünstigt. In jüngster Zeit konnten mehrere Arbeitsgruppen die Bedeutung gerade der mechanischen Stimulation von Knochenzellen durch Strömungskräfte *in vitro* (auch im Vergleich zu hydrostatischem Druck und Deformierung des Trägergerüsts) nachweisen und dokumentierten explizit deren positive Auswirkungen auf zahlreiche

4. Allgemeine Diskussion

relevante biochemische Faktoren wie z.B. intrazelluläres Calcium, Stickoxid und Prostaglandin E₂ [Bakker et al., 2001; Bancroft et al., 2002; Vance et al., 2005].

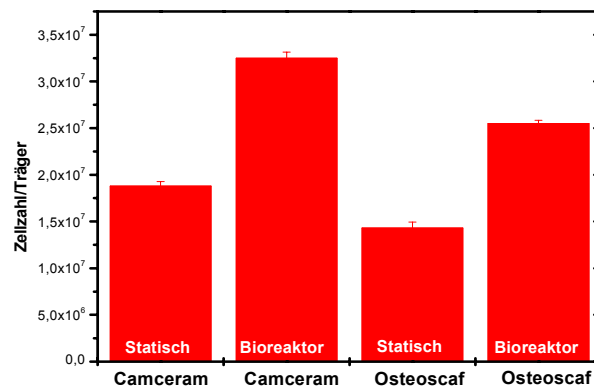


Abb. 4.58: Vergleich der Zellzahl pro Trägergerüst (Camceram und Osteoscaf) nach 10 Tagen Kultivierung in statischen Kulturen und im Bioreaktor (die Grafik wurde aus den Grafiken 3.43C, 3.49C und 3.57C zusammengefasst). Dabei zeigte sich, dass die Proliferation der osteogenen Kaninchenzellen im Bioreaktor signifikant besser ist.

Zusätzlich hat das hier vorgestellte Perfusionssystem auch den Vorteil empfindlichere Gerüststrukturen wie Osteoscaf in der Langzeitkultur deutlich besser zu erhalten. Somit lassen sich viele Probleme der in der Literatur beschriebenen Kulturmethoden überwinden und bessere Ergebnisse erzielen. Meinel et al. konnten hingegen in dem von ihnen entwickelten Perfusionssystem nicht die gleichen Ergebnisse erzielen. In ihrer Studie verglichen sie ihre Perfusionskammer mit statischen und Spinnerflaschenkulturen, wobei mesenchymale Stammzellen aus humanem Knochenmark zum Einsatz kamen und auf Scheiben aus spongiösem Kollagen-I kultiviert wurden. Dabei zeigten sich besonders in der Langzeitkultur über 5 Wochen deutliche Vorteile der Spinnerkultur gegenüber dem Perfusionssystem. Die Calciummenge in der extrazellulären Matrix war in den Trägergerüsten der Spinnerkultur dreimal höher als im Perfusionssystem. Dies scheint jedoch vorwiegend auf spezifische Eigenschaften des sich ohnehin im Nährmedium stark formverändernden Trägergerüstmaterials zurückzuführen sein [Meinel et al., 2004]. Diese Ergebnisse stehen im direkten Widerspruch zu den eigenen Erfahrungen mit Osteoscaf-Gerüstträgern und belegen, dass das Kultivierungssystem jeweils mit dem zu verwendenden Trägergerüst bzw. dessen Materialeigenschaften abzustimmen ist. Das eingesetzte Perfusionsbioreaktorsystem bietet insgesamt exzellente Möglichkeiten aus Trägergerüsten, speziell bei Langzeitkultivierungen, unter Erhalt ihre dreidimensionalen Gerüststruktur mit einer steuerbaren Strömungsrate bei einem kontinuierlichen Medienaustausch hochvitale Implantate herzustellen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden die experimentellen Kulturbedingungen für die *In-vitro*-Herstellung vitaler und funktionaler Kaninchenknochenimplantate etabliert und optimal angepasst. Zudem wurde die Besiedlung und Kultivierung von als Prototypen verfügbaren Trägergerüsten mit osteogenen Zellen des Kaninchenmodells durchgeführt. Dafür wurde die Qualität verschiedene Kulturmediumansätze (ZKT-I, 10% FBS) mit und ohne osteogene Faktoren bezüglich der Gewinnung und Expansion der Knochen-vorläuferzellen aus Knochenmark untersucht. Anhand der gewonnenen Daten konnte nachgewiesen werden, dass der Zusatz der osteogenen Faktoren einen deutlich positiven Einfluss auf die Zellteilung und Kolonienbildung hatte. Durch die Charakterisierung der isolierten Zellen und die Untersuchungen zu deren Subkultivierung gelang es eine reproduzierbare Methode zu etablieren, Vorläuferzellen *in vitro* zu ausreichenden Mengen zu vermehren. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass die verwendeten osteogenen Kaninchenzellen in der Lage sind eine vollständige Differenzierung zu Osteoblasten zu durchlaufen. Dies wurde auf biochemischer und histologischer Ebene gezeigt.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von speziesspezifischem Serum (Kaninchenserum) auf die Entwicklung der Vorläuferzellen, um das Risiko von Gewebeabstoßungen bei den geplanten Implantationen in Knochendefekte zu minimieren. Es konnte gezeigt werden, dass die mit zunehmender Serumkonzentration festgestellte, verstärkte Proliferation osteogener Zellen im wesentlichen mit einem auf ein unerwünschtes Maß erhöhten Anteil an Adipocyten einherging, wodurch die potenziellen Kompatibilitätsvorteile des Kaninchensersums negiert wurden.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass unter Einfluss des Kaninchensersums eine unerwünschte Adipogenese stattfand, verstärkte sich die Notwendigkeit zur Entwicklung eines Serum-reduzierten Mediums. Nach eingehender Untersuchung der Wirkung verschiedener Cytokine auf die Proliferation der Zellen wurde ein Cytokin-Cocktail aus EGF, PDGF-BB und FGF2 für die Zellproliferation als optimal identifiziert. Der Serumanteil im Medium konnte dabei von 10% FBS auf 1% reduziert werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Da sich das entwickelte Serum-reduzierte Medium jedoch retardierend auf die Zelldifferenzierung auswirkte, wurden die Zellen in einem zweistufigen Verfahren kultiviert, wobei die Cytokine entfernt wurden, um die nachfolgende Zelldifferenzierung und ECM-Mineralisierung einzuleiten. Somit war es möglich Zellvermehrung und Zelldifferenzierung gezielt zu steuern.

Des Weiteren wurde im Rahmen des EU-Projekts *Tissue Reactor* das Serum-reduzierte Medium in Kombination mit einer Perfluorcarbon-Emulsion als Sauerstoffträger speziell für die Kultivierung von besiedelten Trägergerüsten mit höherer Besiedlungsdichte getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die PFC-Emulsion zu deutlich schlechterer Adhärenz und geringerer Proliferation führte. Sie wurde daher in weiteren Experimenten zur 3D-Kultivierung nicht mehr zum Einsatz gebracht.

Das in der Arbeitsgruppe entwickelte Perfusionsbioreaktorsystem erwies sich als gut geeignet für die 3D-Langzeitkultivierung osteogener Kaninchenzellen und zeigte Vorteile gegenüber statischer Kultivierung und dem dynamischen 3D-System. Mit der kontrollierten Durchströmung des Trägergerüstes mit kontinuierlich erneuertem Nährmedium wurde bei 30-tägigen Kultivierungen im Perfusionsbioreaktorsystem maximales Zellwachstum und die schnellste Differenzierung erreicht. Im Gegensatz zur 2D-Kultivierung, bei der erst über den Wechsel zu Cytokin-freiem Medium die Differenzierung eingeleitet wurde, erfolgte diese aufgrund der osteokonduktiven Eigenschaften der Trägergerüstmaterialien in 3D-Kultur bereits früher und trotz Präsenz der Cytokine. Somit erlaubt das Perfusionssystem günstige Bedingungen um Implantate herzustellen. Des Weiteren bestätigen die rasterelektronen- und lichtmikroskopischen Aufnahmen mit dem selbst optimierten Protokoll zur histologischen Untersuchung der Trägergerüste die Kolonisierung, das Anheften, die Proliferation sowie die Differenzierung der Zellen.

Die Qualität des Konstruktes muss letztendlich durch *In-vivo*-Versuche basierend auf den hier vorliegenden Ergebnissen in einem geeigneten Modell evaluiert werden, um das Potential für einen klinischen Einsatz beim Menschen beurteilen zu können. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Zellen der Kaninchenrasse *New Zealand White Rabbit* als Tiermodell verwendet. In diesem Tier lassen sich Knochendefekte einer relevanten, nicht ohne Implantate verheilenden Größe von 1 cm³ herstellen und erlauben eine anschließende Implantation des Materials zur Verifizierung der Qualität *in vivo*. In weiteren Studien sollen dabei auch die Charakteristika der Bioresorption

5. Zusammenfassung und Ausblick

sowie der mechanischen Stabilität der angewendeten Trägergerüstmaterialien während der Knochenheilung überprüft werden. Entsprechende Tierversuche laufen zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit am Universitätsklinikum Marburg.

6. Literaturverzeichnis

Angele P., Kujat R., Nerlich M., Yoo J., Goldberg V., Johnstone B.: Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng.* **5**, 545-554, 1999.

Anselme K., Noel B., Flautre B., Blary M.C., Delecourt C., Descamps M., Hardouin P.: Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration. *Bone* **25**, 51-54, 1999.

Arnold U., Lindenhayn K., Perka C.: In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials* **23**, 2303-2310, 2002.

Arrington E.D., Smith W.J., Chambers H.G., Bucknell A.L., Davino N.A.: Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **329**, 300-309, 1996.

Antosz M.E., Bellows C.G., Aubin J.E.: Biphasic effects of epidermal growth factor on bone nodule formation by isolated rat calvaria cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **2**, 385-393, 1987.

Aronow M.A., Gerstenfeld L.C., Owen T.A., Tassinari M.S., Stein G.S., Lian J.B.: Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J. Cell. Physiol.* **143**, 213-221, 1990.

Aubin J.E.: Advances in the osteoblast lineage. *Biochem. Cell. Biol.* **76**, 899-910, 1998.

Aubin J.E.: Osteogenic cell differentiation. In: Davies J.E. (ed.): *Bone engineering, em squared*, Toronto, 19-30, 2000.

Bakker A.D., Soejima K., Klein-Nulend J., Burger E.H.: The production of nitric oxide and prostaglandin E₂ by primary bone cells is shear stress dependent. *J. Biomech.* **34**, 671-677, 2001.

Baksh D., Davies J.E.: Design strategies for 3-dimensional in vitro bone growth in tissue engineering scaffolds. In: Davies, J.E. (ed.), *Bone engineering, em squared*, Toronto, 488-495, 2000.

Bancroft G.N., Sikavitsas V.I., Van den Dolder J., Sheffield T.L., Ambrose C.G., Jansen J.A., Mikos A.G.: Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 12600-12605, 2002.

Barnes G.L., Kostenuik P.J., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A.: Growth factor regulation of fracture repair. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1805-1815, 1999.

Banks W.J.: Supportive Tissues, Bone. In: Banks W.J., *Applied Veterinary Histology*, 3rd Edition. Mosby Year Book, Baltimore, 107-126, 1993.

Baron R.: Anatomy and Ultrastructure of Bone. In: Favus M.J., Goldring S.R., Hendy G.N., Holick M.F., Kaplan F., Khosla S., Kleerekoper M., Langman C.B., Lian J.B., Shane E., Shoback D.M., Stewart A.F., Whyte M.P., Christakos S. (eds.): *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Raven Press, New York, 3-9, 1993.

6. Literaturverzeichnis

- Barthold M.: Züchtung primärer osteogener Zellen auf neuartigen Gerüststrukturen in Kleinf fermentern zur Herstellung von Knochenimplantaten in vitro. Dissertation Technische Universität Braunschweig, 2003.
- Bellows C.G., Aubin J.E., Heersche J.N.: Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology*. **121**, 1985-1992, 1987.
- Bellows C.G., Heersche J.N., Aubin J.E.: Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner.* **17**, 15-29, 1992.
- Blair H.C., Teitelbaum S.L., Ghiselli R., Gluck S.: Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, **245**, 855-857, 1989.
- Boskey A.L.: The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **2**, 369-387, 1991.
- Boyan B.D., Hummert T.W., Dean D.D., Schwartz Z.: Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* **17**, 137-146, 1996.
- Breitbart A.S., Grande D.A., Kessler R., Ryaby J.T., Fitzsimons R.J., Grant R.T.: Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast. Reconstr. Surg.*, **101**, 567-574, 1998.
- Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E.: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* **64**, 278-94, 1997.
- Buckwalter J.A., Glimcher M.J., Cooper R.R., Recker R.: Bone biology part I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *J. Bone Joint Surg.* **77-A**, 1256-1274, 1996.
- Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S., Bennett P.R., Bellantuono I., Fisk N.M.: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98**, 2396-2402, 2001.
- Canalis E., Raisz L.G.: Effect of Epidermal Growth Factor on bone formation in vitro. *Endocrinology* **104**, 862-870, 1979.
- Canalis E., Centrella M., McCarthy T.: Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J. Clin. Invest.* **81**, 1572-1577, 1988.
- Caplan A.I.: Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9**, 641– 650, 1991.
- Caplan A.I., Bruder S.P.: Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med.* **7**, 259-264, 2001.
- Centrella M., McCarthy T.L., Canalis E.: Receptors for insulin-like growthfactors-I and -II in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* **126**, 39-44, 1990.
- Chaplin A.J., Grace S.R.: Calcium oxalate and the von Kossa method with reference to the influence of citric acid. *Histochem. J.* **7**, 451-458-1975.
- Charbord P., Oostendorp R., Pang W., Herault O., Noel F., Tsuji T., Dzierzak E., Peault B.: Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal, and postnatal mouse blood-forming tissues. *Exp. Hematol.* **30**, 1202-1210, 2002.

6. Literaturverzeichnis

Chaudhary, L.R., Hofmeister, A.M., Hruska, K.A.: Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone* **34**, 402-411, 2004.

Cheng H., Jiang W., Phillips F.M., Haydon R.C., Peng Y., Zhou L., Luu H.H., An N., Breyer B., Vanichakarn P., Szatkowski J.P., Park J.Y., He T.C.: Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J. Bone Joint Surg. Am.* **85-A**, 1544-1552, 2003.

Chenu C., Valentin-Opran A., Chavassieux P., Saez S., Meunier P. J., Delmas P. D. : Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)₂D₃ and activity on human osteoblast-like cells in shorts-term cultures. *Bone*, **11**, 81-86, 1990.

Chow J.W., Wilson A.J., Chambers T.J., Fox S.W.: Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 1760-1767, 1998.

Christenson R.H.: Biochemical markers of bone metabolism: An overview. *Clin. Biochem.* **30**, 573-593, 1997.

Clark A.G., Rohrbaugh A.L., Otterness I., Kraus V.B.: The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants. *Matrix Biol.* **21**, 175–184, 2002.

Coelho M.J.; Fernandes M.H.: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* **21**, 1095-1102, 2000.

Cook D.S., Salkeld S.L., Rueger D.C.: Comparison of osteoinductive and osteoconductive biomaterials in healing large segmental bone defects. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, Paper no. 005, 1995.

Cross P.C., Mercer K.L. : Le tissu conjonctif. In : Cross P.C., Mercer K.L. (eds.) *Ultrastructure cellulaire et tissulaire, approche fonctionnelle*. De Boeck-Université, Bruxelles, 69-93, 1995.

Cuneyt T. A., Korkusuz F., Timucin M., Akkas N.: An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **8**, 91-96, 1997.

Dalby M.J., Di Silvio L., Davies G.W., Bonfield, W.: Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **11**, 805-810, 2000.

Davies, J.E. (ed.): *Bone engineering, em squared*, Toronto, 2000.

Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., Phinney D.G., Class R., Prockop D.J.: Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* **107**, 275-281, 1999.

Diascro Jr. D.D., Vogel R.L., Johnson T.E., Witherup K.M., Pitzemberger S.M., Rutledge S.J., Prescott D.J., Rodan G.A., Schmidt A.: High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 96-106, 1998.

Duncan R.L., Turner C.H.: Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int.* **57**, 344-358, 1995.

6. Literaturverzeichnis

Ehrler D.M., Vaccaro A.R.: The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **371**, 38-45, 2000.

Elgendy H.M., Norman M.E., Keaton A.R., Laurencin C.T.: Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: An approach towards the development of bone-bioerodible polymer composite material. *Biomaterials*, **14**, 263-269, 1993.

Franceschi R.T., Iyer B.: Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* **7**, 235–246, 1992.

Franceschi R.T., Iyer B.S., Cui, Y.: Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 843–854, 1994.

Franceschi R.T., Wilson J.X., Dixon S.J.: Requirement for Na(+)-dependent ascorbic acid transport in osteoblast function. *Am. J. Physiol.* **268**, 1430-1439, 1995.

Freed L.E., Vunjak-Novakovic G.: Cultivation of cell-polymer constructs in simulated microgravity. *Biotechnol. Bioeng.* **46**, 306-313, 1995.

Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro II, Petrakova K.V.: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **16**, 381-390, 1966.

Friedenstein A.J., Latzinik N.V., Gorskaya Yu.F., Luria E.A., Moskvina I.L.: Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells. *Bone Miner.* **18**, 199-213, 1992.

Gerstenfeld L.C., Chipman S.D., Glowacki J., Lian J.B.: Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev. Biol.* **122**, 49–60, 1987.

Gloria A.G., Mary-Beth M., Hai Z., Wenjian Z.: Insulin-like growth factor II induces apoptosis in osteoblasts. *Bone*, **35**, 621-628, 2004.

Granet C., Laroche N., Vico L., Alexandre C., Lafage-proust M.H.: Rotating-wall vessels, promoting bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **36**, 513-519, 1998.

Goldstein A.S., Juarez T.M., Helmke C.D., Gustin M.C., Mikos A.G.: Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* **22**, 1279-1288, 2001.

Goshima J., Goldberg V.M., Caplan A.I.: The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin. Orthop.* **262**, 298-311, 1991.

Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., Robey P.G., Storms R.W., Gimble J.M.: Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.* **189**, 54-63, 2001.

Hale L.V., Ma Y.F., Santerre R.F.: Semi-quantitative fluorescence analysis of calcein binding as a measurement of in vitro mineralization. *Calcif. Tissue Int.*, **67**, 80-84, 2000.

Hart K. A., Campbell J. K., Brown E., Johnstone D.: Analysis of the adipocytic phenotype of RC2. An immortalized osteosarcoma cell line. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 231, 1994.

6. Literaturverzeichnis

- Hata R., Hori H., Nagai Y., Tanaka S., Kondo M., Hiramatsu M., Utsumi N., Kumegawa M.: Selective inhibition of type I collagen synthesis in osteoblastic cells by epidermal growth factor. *Endocrinology* **115**, 867–876, 1984.
- Hauschka P.V., Lian J.B., Cole D.E.C., Gundberg C.M.: Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.* **69**, 990-1047, 1989.
- Haynesworth S.E., Goshima J., Goldberg V.M., Caplan A.I.: Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, **13**, 81-88, 1992.
- Heldin C.H., Westermark B.: PDGF-like growth factors in autocrine stimulation of growth. *J. Cell. Physiol.* **5**, 31-34, 1987.
- Holtorf H.L., Jansen J.A., Mikos A.G.: Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stromal cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. *J. Biomed. Mater. Res. A* **72**, 326-334, 2005.
- Kroese-Deutman H.C., Quinten R.P., Spauwen P.H.M., Jansen J.A.: Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants inserted at an ectopic site in rabbits. *Biomaterials* **26**, 1131-1138, 2005.
- Hock J.M., Centrella M., Canalis E.: Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* **122**, 254-260, 1988.
- Hock J.M., Canalis E.: Platelet derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology* **134**, 1423-1428, 1994.
- Hollinger J.O., Schmitz J.O., Mark D.E., Seyfer A.E.: Osseous wound healing with xenogenic bone implants with biodegradable carrier. *Surgery* **107**, 50-54, 1990.
- Holy C.E., Shoichet M.S., Davies J.E.: Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds; Investigating initial cell-seeding density and culture period. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 376-382, 2000a.
- Holy C.E., Fialkov J.A., Shoichet M.S., Davies J.E.: In vivo models for bone tissue tissue-engineering constructs. In: Davies, J.E. (ed.), *Bone Engineering*, em squared, Toronto, 2000b.
- Hurley M.M., Abreu C., Gronowitz G., Kawaguchi H., Lorenzo J.: Expression and regulation of basic fibroblast growth factor mRNA levels in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 9392-9396, 1994.
- Hutmacher D.W.: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, **21**, 2529-2543, 2000.
- Ishaug-Riley S.L., Crane G.M., Gurlek A., Miller M.J., Yasko A.W., Yaszemski M.J., Mikos A.G.: Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-coglycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J. Biomed. Mater. Res.* **36**, 1–8, 1997a.
- Ishaug-Riley S.L., Crane G.M., Miller M.J., Yasko A.W., Yaszemski M.J., Mikos A.G.: Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* **36**, 17-18, 1997b.
- Ishaug-Riley S.L., Crane G.M., Yaszemski M.J., Mikos A.G.: Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* **19**, 1405-1412, 1998.

6. Literaturverzeichnis

Jäger, V., Lehmann, J., Friedl, P.: Serum-free growth medium for the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred bioreactors. *Cytotechnology*. **1**, 319-329, 1988.

Jäger, V., Barthold, M.: Bioreactor for cultivating cells on a matrix. US Patent appl. 10/816113, 2003.

Javazon E.H., Colter D.C., Schwarz E.J., Prockop D.J.: Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* **19**, 219-225, 2001.

Jonas A.: Physicochemical Properties of bovine seum high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **247**, 7767-7772, 1972.

Kaito T., Myoui A., Takaoka K., Saito N., Nishikawa M., Tamai N., Ohgushi H., Yoshikawa H.: Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite. *Biomaterials* **26**, 73-79, 2005.

Kikuchi M., Koyama Y., Takakuda K., Miyairi H., Shirahama N., Tanaka J.: In vitro change in mechanical strength of β -tricalcium phosphate/copolymerized poly L-lactide composites and their application for guided bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* **62**, 265-272, 2002.

Kim S.S., Park M.S., Jeon O., Choi C.Y., Kim B.S.: Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 1399-1409, 2006.

Kim H.D., Valentini R.F.: Human osteoblast response in vitro to platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta delivered from controlled-release polymer rods. *Biomaterials*. **18**, 1175-1184, 1997.

Koempel J.A., Patt B.S., O'Grady K., Wonzney J., Touriumi D.M.: The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the integration of porous hydroxyapatite implants with bone. *J. Biomed. Mater. Res.* **41**, 359-363, 1998.

Komarova S.V., Ataullakhanov F.I., Globus R.K.: Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts. *Am. J. Cell Physiol.* **279**, 1220-1229, 2000.

Klein C.P., de Blieck-Hogervorst J.M., Wolke J.G., de Groot K.: Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. *Biomaterials* **11**, 509-512, 1990.

Kuznetsov S.A., Friedenstein A.J., Robey P.G.: Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br. J. Haematol.* **97**, 561-570, 1997.

Kuznetsov S.A., Mankani, M.H., Gronthos S., Satomura K., Bianco, P., Robey, P.G.: Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* **153**, 1133-1140, 2001.

Kwon S.H., Jun Y.K., Hong S.H., Kim H.E.: Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders. *J. Eur. Ceram. Soc.* **23**, 1039-1045, 2003.

Leaffer D., Sweeney M., Kellerman L.A., Avnur Z., Krstenansky J.L., Vickery B.H., Caulfield J.P.: Modulation of osteogenic cell ultrastructure by RS-23581, an analog of human parathyroid hormone (PTH)-related peptide-(1-34), and bovine PTH-(1-34). *Endocrinology* **136**, 3624-3631, 1995.

Lee A. J., Hodges S., Eastell R.: Measurement of osteocalcin. *Ann. Clin. Biochem.*, **37**, 432-446, 2000.

6. Literaturverzeichnis

- Lennon D.P., Haynesworth S.E, Bruder S.P., Jaiswal N., and Caplan A.I.: Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: identification of serum optimal selection and proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **32**, 602-611, 1996.
- Levine J.P., Bradley J., Turk A.E., Ricci J.L., Benedict J.J., Steiner G., Longaker M.T., McCarthy J.G.: Bone morphogenetic protein promotes vascularization and osteoinduction in preformed hydroxyapatite in the rabbit. *Ann. Plast. Surg.* **39**, 158-168, 1997.
- Low M.G., Saltiel A.R.: Structural and functional roles of of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Scienc* **239**, 268-275, 1988.
- Lynch S.E., Nixon J.C., Colvin R.B., Antoniades H.N.: Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7696-7700, 1987.
- Lynch M.P, Capparelli C, Stein J.L., Stein G.S., Lian J.B.: Apoptosis during bone-like tissue development in vitro. *J. Cell. Biochem.* **68**, 31-49, 1998.
- Machwate M., Zerath E., Holy X., Hott M., Gdet D., Lomri A., Marie P.J.: systemic administration of transforming growth factor- β 2 prevents the impaired bone formation and osteopenia by unloading in rats. *J. Clin. Invest.*, **96**, 1245-1253, 1995.
- Magnusson P., Larsson L., Magnusson M., Davie M.W.J., Sharp C.A.: Isoforms of bone alkaline phosphates; Characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1926–1933, 1999.
- Majore I.: Optimierung der Kultivierung und Monitoring der Proliferation und Differenzierung humaner primärer Knochenvorläuferzellen. Dissertation Technische Universität Braunschweig, 2005.
- Malaval L., Modrowski D., Gupta A.K., Aubin J.E.: Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J. Cell. Physiol.* **158**, 555-572, 1994.
- Manolagas S.C.: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **21**, 115-137, 2000.
- Maniatopoulos C., Sodek J., Melcher A.H.: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* **254**, 317-330, 1988.
- Marks S.C., Hermey D.C.: The structure and development of bone. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.), *Principles of Bone Biology*, Acad. Press, New York, 3-14, 1996.
- Mayahara H., Ito T., Nagai H., Miyajima H., Tsukuda R., Taketomi S., Mizoguchi J., Kato K.: In vivo stimulation of endosteal bone formation by basic fibroblast growth factor in rats. *Growth Factors* **9**, 73-80, 1993.
- Meinel L., Karageorgiou V., Fajardo R., Snyder B., Shinde-Patil V., Zichner L., Kaplan D., Langer R., Vunjak-Novakovic G.: Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: Effects of scaffold material and medium flow. *Ann. Biomed. Eng.* **32**, 112-122, 2004.
- Miller S.C., Jee W.S.S.: The bone lining cell: A distinct phenotype?. *Calcif. Tissue Int.* **41**, 1-5, 1987.

6. Literaturverzeichnis

Minuth W.W., Strehl R., Schumacher K.: Zukunftstechnologie Tissue Engineering - Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Wiley-VCH, Weinheim, 2003.

Mitlak B.H., Finkelman R.D., Hill E.L., Li J., Martin B., Smith T., D'Andrea M., Antoniades H.N., Lynch S.E.: The effects of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. *J. Bone Miner. Res.* **11**, 238-247, 1996.

Moll K.J., Moll M.: Anatomie, 16. Auflage, 2000.

Mueller S.M., Mizuno S., Gerstenfeld L.C., Glowacki J.: Medium perfusion enhances osteogenesis by murine osteosarcoma cells in three-dimensional collagen sponges. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 2118-2126, 1999.

Mueller S.M., Glowacki J.: Construction and regulation of 3-dimensional bone tissue in vitro. In: Davies, J.E. (ed.): Bone engineering, em squared, Toronto, 473-487, 2000.

Mundy G.R., Chen D., Zhao M., Dallas S., Xu C., Harris S.: Growth regulatory factors and bone. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2**, 105-115, 2001.

Nakamura T., Hanada K., Tamura M., Shibunushi T., Nigi H., Tagawa M., Fukomoto S., Matsumoto T.: Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology* **136**, 1276-1284, 1995.

Nawawi H., Samson D., Apperley J., Girgis S.: Biochemical bone markers in patients with multiple myeloma. *Clin. Chim. Acta.* **253**, 61-77, 1996.

Ng K.W., Partridge N.C., Niall M., Martin T.J.: Epidermal growth factor receptors in clonal lines of a rat osteogenic sarcoma and in osteoblast-rich rat bone cells. *Calcif. Tissue Int.* **35**, 298-303, 1983a.

Ng K.W., Partridge N.C., Niall M., Martin T.J.: Stimulation of DNA synthesis by epidermal growth factor in osteoblast-like cells. *Calcif. Tissue Int.* **35**, 624-628, 1983b.

Nissley P., Kiess W.: Reciprocal modulation of binding of lysosomal enzymes and insulin-like growth factor-II (IGF-II) to the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor. *Adv. Exp. Med. Biol.* **293**, 311-324, 1991.

Notoya K., Nagai H., Oda T., Gotoh M., Hoshino T., Muranishi H., Taketomi S., Sohda T., Makino H.: Enhancement of osteogenesis in vitro and in vivo bei a novel osteoblast differentiation promoting, TAK-778. *J. Pharm. Exp. Therap.* **290**, 1054-1064, 1999.

Nuttall M.E., Olivera D.L., Gown M.: Control of osteoblast/adipocyte differentiation in MG-63 cells. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 166, 1994.

Ogata T.: Increase in epidermal growth factor receptor protein induced in osteoblastic cells after exposure to flow of culture media. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **285**, C425-432, 2003.

Okazaki R., Ikeda K., Sakamoto A., Nakano T., Morimoto K., Kikuchi T., Urakawa K., Ogata E., Matsumoto T.: Transcriptional activation of c-fos and c-jun protooncogenes by serum growth factors in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* **7**, 1149-1155, 1992.

Oreffo R.O.C., Viridi A.S., Triffitt J.T.: Modulation of osteogenesis and adipogenesis by human serum in human bone marrow cultures. *Eur. J. Cell. Biol.* **74**, 251-261, 1997.

6. Literaturverzeichnis

- Otsuka E., Yamaguchi A., Hirose S., Hagiwara H.: Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. *Am. J. Physiol.* **277**, 132-138, 1999.
- Owen M.: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: Peck, W. A. (ed.), *Bone and mineral research* Vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 1-25, 1985.
- Owen T., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B., Stein G.S.: Progressive development of the Rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.* **143**, 420-430, 1990.
- Parfitt A., Drezner M., Glorieux F., Kanis J., Malluche H., Meunier P., Ott S., Recker R.: Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* **2**, 595-610, 1987.
- Park S.R., Oreffo R.O.C., Triffitt J.T.: Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone* **24**, 549-554, 1999.
- Peter S.J., Liang K.R., Kim D.J., Widmer M.S., Mikos A.G. (1998). Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, β -glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *J. Cell. Biochem.* **71**, 55-62, 1998.
- Peter S.J., Lu L., Kim D.J., Mikos A.G.: Marrow stromal osteoblast funktion on a poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate biodegradable oethopaedic composite. *Biomaterials* **21**, 1207-1213, 2000.
- Pfeilschifter J., Diel I., Pilz U., Brunotte K., Naumann A., Ziegler R.: Mitogenic responsiveness of human bone cells in vitro to hormones and growth factors decreases with age. *J. Bone Miner. Res.* **8**, 707-717, 1993.
- Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altmann, B.W., Deuel, T.F., Thomason, A.: Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J. Cell. Biochem.* **45**, 319-326, 1991.
- Piche J.E., Graves D.T.: Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: A comparison with human fibroblasts. *Bone* **10**, 131-138, 1989.
- Piattelli A., Franco M., Ferronato G., Santello M.T., Martinetti R., Scarano A.: Resorption of composite polymer-hydroxyapatite membrane. A time course study in Rabbits. *Biomaterials* **18**, 629-633, 1997.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147, 1999.
- Pittenger M.F., Mosca J.D., McIntosh K.R.: Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **251**, 3-11, 2000.
- Pollak M.N., Polychronakos C., Richard M.: Insulinlike growth factor I: A potent mitogen for human osteogenic sarcoma. *J. Natl. Cancer. Inst.* **82**, 301-305, 1990.
- Poser J.W., Esch F.S., Ling N.C., Price P.A.: Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *J. Biol. Chem.* **255**, 8685-8691, 1980.

6. Literaturverzeichnis

- Price P.A., Nishimoto S.K.: Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 2234-2238, 1980.
- Pri-Chen S., Pitaru S., Lokiec F., Savion N.: Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone-like cells in culture. *Bone* **23**, 111-117, 1998.
- Prockop D.J.: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-74, 1997.
- Putnam A.J., Mooney D.J.: Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. *Nat. Med.* **2**, 824-826, 1996.
- Qui Q.Q., Duscheyne P., Ayyaswamy P.S.: Fabrication, characterisation and evaluation of bioceramic hollow microspheres used as microcarriers for 3-D bone tissue formation on rotating bioreactors. *Biomaterials* **20**, 989-1001, 1999.
- Radomsky M.L., Thompson A.Y., Spiro R.C. und Poser J.W.: Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **355**, 283-293, 1998.
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M.: Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, **98**, 2615-2625, 2001.
- Robinson D., Bab I., Nevo Z.: Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* **10**, 690-696, 1995.
- Rodan S.B., Wesolowski G., Thomas K.A., Yoon K., Rodan G.A.: Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on osteoblastic cells. *Conn. Tiss. Res.* **20**, 283-288, 1989.
- Rodan G.A., Heath J.K., Yoon K., Noda M., Rodan S.B.: Diversity of the osteoblastic phenotype. In: Evered D., Harnett S.: *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue*. J. Wiley, Chichester, UK, 78-91, 1988.
- Röhlke W., Reuter P., Franke R.P.: Heat sterilisable and long time storable perfluorocarbon emulsions based on EO-PO-blockpolymers. *Biorheology* **36**, 162, 1999.
- Rosen C.J.: Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: Clinical implications. *Clin. Chem.* **45**, 1384-1390, 1999.
- Saito N., Okada T., Horiuchi H., Murakami N., Takahashi J., Nawata M., Ota H., Miyamoto S., Nozaki K., Takaoka K.: Biodegradable poly-D,L-lactic-polyethylene glycol block copolymers as a BMP delivery system for inducing bone. *J. Bone Joint Surg. Am.*, **83**, 92-98, 2001.
- Schäffler, A. Schmid, S.: *Mensch, Körper, Krankheit*. Urban und Fischer, München, S.50. 1997.
- Shea L.D., Wang D., Franceschi R.T, Mooney D.J.: Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three dimensional scaffolds. *Tissue Eng.* **6**, 605-617, 2000.
- Sikavistas V.I., Bancroft G.N., Mikos A.G.: Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J. Biomed. Mater. Res.* **62**, 136-148, 2002.

6. Literaturverzeichnis

- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85, 1985.
- Sun M.H., Cheng H., Phillips F.M., Peng Y., Kang Q., Haydon R.C., He T.-C.: Bone morphogenetic proteins and bone regeneration; From biology to clinical applications. *Adv. Osteoporotic Fracture Manage.* **2**, 70–78, 2003.
- Szczesny G.: Molecular aspects of bone healing and remodelling. *Pol. J. Pathol.* **53**, 145-153, 2002.
- Thomson R.C., Yaszemski M.J., Powers J.M., Mikos A.G.: Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *J. Biomater. Sci., Polymer Edn.* **7**, 23-38, 1995.
- Till, J.E., McCulloch E.A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. *Rad. Res.* **14**, 1419–1430, 1961.
- Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S., Byrne B.J., Kessler P.D.: Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* **105**, 93-98, 2002.
- Thomas T., Gori F., Khosla S., Jensen M.D., Burguera B., Riggs L.: Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* **140**, 1630-1638, 1999.
- Tontonoz P., Hu. E., Spiegelman B.M.: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* **79**, 1147-1156, 1994.
- Toppets V., Pastoret V., De Behr V., Antoine N., Dessy, C., Gabriel A.: Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét.* **148**, 1-13, 2004.
- Trippel S.B., Coutis R.D., Einhorn T.A., Mundy G.R., Rosenfeld R.G.: Growth factors as therapeutic agents. *J. Bone Joint Surg. Am.* **78**, 1272-1286, 1996.
- Trippel S.B.: Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **355**, S301-313, 1998.
- Walford R.L., Gillagher R., Sjaard J.R.: Serolytic typing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting. *Science* **141**, 868-870, 1964.
- Wang M: Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* **24**, 2133-2151, 2003.
- Ward I.M., Bonfield W., Iadizesky N.H.: The development of load-bearing bone substitute materials. *Polym. Int.* **43**, 333-337, 1997.
- Wlodarski K.H.: Alkaline and acid phosphatase activity in murine femoral bone marrow following X-irradiation, or X-irradiation and repopulation with syngenic or allogeneic bone marrow or marrow stroma cells. *Folia Biol. (Krakow)* **38**, 49-56, 1990.
- Vunjak-Novakovic G., Obradovic B., Martin I., Bursac P.M., Langer R., Freed L.E.: Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol. Prog.* **14**, 193-202, 1998.

6. Literaturverzeichnis

Väänänen K.: Osteoclast function: biology and mechanism. In Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.): Principles of Bone Biology, Acad. Press, New York, 103-113, 1996.

Vacanti J.P, Langer R.: Tissue engineering. Science **260**, 920, 1985.

Vance J., Galley S., Liu D.F., Donahue S.W.: Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E₂ release. Tissue Eng. **11**, 1832-1839, 2005.

Yang D., Chen J., Jing Z., Jin D.: Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA: A self-imposed cytokine in the proliferation of human fetal osteoblasts. Cytokine **12**, 1271-1274, 2000.

Yaszemski M.J., Payne R.G., Hayes W.C., Langer R., Mikos A.G.: Evolution of bone transplantation: Molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. Biomaterials **17**, 175-85, 1996.

Ylikoski A., Hellman J., Matikainen T., Kakonen S.M., Karp M., Väänänen H.K., Lovgren T., Pettersson K.: A dual-label immunofluorometric assay for human osteocalcin. J. Bone Miner. Res. **13**, 1183-1190, 1998.

Yoneda T.: Local Regulators of Bone: Epidermal growth factor – Transforming growth factor-alpha. In Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. (eds.): Principles of Bone Biology, Acad. Press, New York, 729-738, 1996.

Yu K., Xu J., Liu Z., Sosic D., Shao J., Olson E.N., Towler D.A., Ornitz D.M.: Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. Development **130**, 3063-3074, 2003.

Zhang L., Leeman E., Carnes D.C., Graves D.T.: Human osteoblasts synthesize and respond to platelet derived growth factor. Am. J. Physiol. **261**, 348-354, 1991.

Zhang W., Walboomers X.F., Wolke J.G., Bian Z., Fan M.W., Jansen J.A.: Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro. Tissue Eng. **11**, 357-368, 2005.

7. Abkürzungen

β-TCP	β-Tricalciumphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
BCA	Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CFU-F	Colony Forming Unit - Fibroblast
DAPI	4'-6-Diamino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonucleinsäure)
ECM	Extracellular Matrix (Extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales bovines Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
HA	Hydroxylapatit
H/E	Hematoxylin/Eosin
IGF	Insulin like Growth Factor
LDH	Lactatdehydrogenase
KMSZs	Mesenchymale Stammzellen des Kaninchens
NBT	Nitroblue-Tetrazoliumsals
OC	Osteocalcin
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PLGA	Poly-L-Lactic-Glycolic Acid
PLLA	Poly-L-Lactic Acid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
Strep	Streptomycin
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
U	Units
UPM	Umdrehungen pro Minute